الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية طب الأسنان

قسم النسج والتشريح المرضي

تحرّي الفعالية التكاثرية وتوزّع الخلايا العضلية البشروية في بعض الأورام الخبيثة التي تصيبُ نسيج الغدد اللعابية

Investigation of Proliferative Activity and Distribution of Myoepithelial Cells in Some Salivary Gland Carcinomas

أطروحـــة قدّمت إلى جامعـــة دمشق لنيل درجة الماجستيـــر في

كليـــّة طب الأسنان في اختصاص التشريح المرضي الفموي

إعداد

فيصل محسن العلي

إشراف

الدكتور نبيل نادر قوشجي

كلية طبّ الأسنان – جامعة دمشق

1431هـ/ 2010 م

فهرس المحتويات

جدول الجداول

جدول الأشكال والمخططات البيانية

ملخص

المقدمة والهدف: تُعدُّ الخلية العضلية البشروية كابح طبيعي للورم، فهي تقاوم التحول الورمي، وتملك خصائص مضادة للغزو، وهذا ما جعلها من دفاعات الجسم الهامة ضد السرطان. وتهدف هذه الدراسة إلى تحري فعاليتها التكاثرية في النسيج الغدي السليم وفي السرطان الكيسي المشبه بالغدي، والسرطان المخاطي المشبه بالبشروي.

المواد والطرق: بلغت عينة البحث (33) حالةً، أُخذت من أرشيف مشفى المواساة الجامعي- جامعة دمشق، وبلغت نسبة الذكور(54.54%) بينما الإناث(30.3%)، و(15.15%)مجهولة الجنس، وتراوحت أعمارهم بين (11- 68)، وخضعت الحالات للتقطيع والتلوين التقليدي من جديد، وقد أعيد تشخيصها كالتالي: (10) عينة طبيعية، و(13) سرطان كيسي مشبه بالغدي، و(10) سرطان مخاطي مشبه بالبشروي، وتم قطع كل قالب بسماكة 5 ميكرون، ومن ثم أُزيل منها الشمع البرافيني وعولجت بسائل استرجاع المستضد(citrate buffer, pH 6) بواسطة المايكروويف لمدة 15 دقيقة، وكبحت فعالية البيروكسيداز والفوسفاتاز القلوية في النسيج بالماء الأوكسجيني0.05%(Hydrogen peroxide). واُستخدم نظام EnVision G|2 Doublestain من أجل التلوين المناعي المضاعف لمستضد التكاثر النووي (PCNA) والأكتين. حُضنت العينات بالضد الأول (PCNA) لمدة 30 دقيقة في درجة الحراة، وأُظهر التفاعل باستخدام أنزيم البيروكسيداز وصبغة الـDAB+، وحُضنت العينات بعد ذلك بالضد الثاني (الأكتين) لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، وأُظهر التفاعل باستخدام أنزيم الفوسفاتاز القلوية وصبغة الـ Permanent Red، وغُمرت الشرائح بعد ذلك بهيماتوكلسن مايرز وسُترت في النهاية. وتم عد الخلايا المتكاثرة (PCNA إيجابي) ضمن إجمالي 400 خلية في 5- 10 ساحات عشوائية. وأجري التحليل الإحصائي للبيانات باستخدام اختباركاي مربع.

النتائج: تكاثرت الخلية العضلية البشروية في العينة الطبيعية بنسبة(1.6%) وكان تكاثرها الأعلى في الغدة تحت الفك مقارنة مع النكفة بفروق إحصائية (P=0.008)، ولم يوجد لها أي تمايز في السرطان المخاطي المشبه بالبشروي، في حين لعبت الدور الأساسي في السرطان الكيسي المشبه بالغدي، ووُجدت فروق إحصائية بين تكاثرها وتكاثر الخلية البشروية ضمن النمط الواحد كالمثقب(P=0.019)، والأنبوبي (P=0.002)، في حين كان الأكتين سلبياً في النمط الصلد، كما وُجدت فروق إحصائية بين تكاثر الخلية العضلية البشروية في النمط المثقب والنمط الأنبوبي(P=0.000) وبين فعاليتها في الغدة النكفية والغدة تحت الفك(P=0.000).

الاستنتاجات: إن الخلية العضلية البشروية معرضة للتحول الورمي، وليس لها أي دور في نشوء السرطان المخاطي المشبه بالبشروي، بينما تلعب الدور الأساسي في السرطان الكيسي المشبه بالغدي، والنمط المثقب هو النمط الأكثر تمايزاً، في حين أن النمط الصلد هو الأقل تمايزاً وبالتالي الأسوأ إنذاراً، والسرطان الناشئ عن الغدة تحت الفك أسوأ إنذاراً من السرطان الناشئ عن النكفة.

Abstract

Background: The myoepithelial cell is considered a natural tumor-suppressor as it is reported to resists malignant transformation through its strong anti-invasive properties which provide an important host defense against cancer invasion. The aim of this study was to investigate the proliferative activity of myoepithelial cell in adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma compared with normal salivary glands.

Material and Methods: Thirty-three salivary gland specimens (54.5% males; 30.3% females; 15.15% unknown; age 11–68 years) were retrieved from the archive of University Mouasa hospital, Damascus University. Five microns serial sections were cut. The diagnoses comprised normal salivary gland (n=10), Adenoid cystic carcinoma (n=13), mucoepidermoid carcinoma (n=10). Deparaffinized slides were subjected to microwave pre-treatmen with target retrieval solution (citrate buffer; pH 6; 15min). Endogenous alkaline phosphatase and peroxidase activity was blocked with dual endogenous enzyme block containing hydrogen peroxide (0.05%). For staining for PCNA and α-SMA, EnVision G|2 Doublestain system was applied. The first antibody (Monoclonal anti-PCNA, ready-to-use, Dako) was applied at room temperature for 30 min and was visualized using HRP/DAB+, the second antibody (Monoclonal anti- α-SMA, ready-to-use, Dako) was applied at room temperature for 30min and was visualized using AP/Permanent Red. Mayers hematoxylin was used as a counterstain. The labeling index was determined by calculating the percentage of cycling (PCNA-positive) cells within a total of 400 cells each of specific cell types in 5 to 10 high-power fields in active areas. Statistical analysis of data was assessed using chi square test.

Results: Myoepithelial cells in normal salivary glands revealed low PCNA reactivity (1.6%). The PCNA reactivity in submandibular gland was significantly higher than parotid gland (P=0.008). No myoepithelial Differentiation was found in Mucoepidermoid carcinoma in contrast to adenoid cystic carcinoma where statistical significances between epithelial and myoepithelial cells was found in cribriform and tubular patterns (P=0.019, P=0.002 respectively). On the other hand, α-SMA was negative in solid pattern. Farthermore PCNA-positive myoepithelial cells in cribriform pattern were lower than those of tubular (P=0.000). According to site, PCNA-positive myoepithelial cells in submandibular tumors were higher than those of parotid (P=0.000).

Conclusions: Although, salivary gland tumors may arise from myoepithlial cells, these cells have no any role in histogenesis of Mucoepidermoid carcinoma, in contrast to Adenoid cystic carcinoma where they play a basic role . The cribriform was the most differentiated histologic form studied. While, the solid was the least. Moreover, the adenoid cystic carcinoma of submandibular was the least differentiated compared with that of parotid.

تصريح

" لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تمَّ أخذه بالكامل من عمل آخر أو أُنجِز للحصول على شهادة أخرى في هذه الجامعة أو في أيّة جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي ".

بِسْمِ اللهِ الرَّحمَنِ الرَّحيْم

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿ 1 ﴾ خَلَقَ الْإِنسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿ 2 ﴾ اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿ 3 ﴾ الَّذِي

عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿ 4 ﴾ عَلَّمَ الْإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿ 5 ﴾

الإهـــــــــداء

....إلى كلِّ مَنْ لهُ فضلٌ عليّ....

الشكــر

أشكر الله عز وجل وأحمده، الذي يعود إليه الفضل كله في إنجاز هذا البحث، وأشكرُ بامتنانٍ عميقٍ أستاذي الدكتور **نبيل نادر قوشجي** الذي كان السببَ الفذَّ فــي وجــود هــذا البحــث، ومصدر الدعم الذي ألجأ إليه كلما أقلقتني مشكلة. كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى أعضاء لجنــة الحكم، السادة الأكارم الأستاذ الدكتور **أحمد المناديلي**، والمدرس الدكتور **عمر كوجان** لقبولِهما بتحكيم هذا البحث، وبذلهما الوقتَ والجهدَ لأجل إغنائه وتدقيقه، كما أشكر إدارة كليــة طــب الأسنان ممثلة بالأستاذ الدكتور **محمد يوسف** عميد الكلية، والأستاذ الدكتور **محمــد تينــاوي** وكيل الكلية للشؤون العلمية، والأستاذ الدكتور **سالم ركاب** وكيل الكلية للشؤون الإدارية، كمــا أشكر الأساتذة الكرام في قسم النسج والتشريح المرضي، وزملائي طلاب الدراســات العليــا، وأصدقائي جميعاً، وكل من ساهم و ساعد في إنجاز هذا البحث، ولو بتشجيعٍ بسيط.

الباب الأول

المراجعة النظرية

Literature Review

1. الغدد اللعابية: Salivary glands

1.1. لمحة تشريحية: Anatomy

يوجد في جسم الإنسان ثلاث أزواج من الغدد اللعابية الكبيرة (Major salivary glands) وهي النكفة (Parotid)، وتحت الفك (Submandibular)، وتحت اللسان (Sublingual)، وتوجد هذه الغدد خارج الحفرة الفموية وتتصل بها من خلال أقنيتها المفرغة إضافة إلى غدد لعابية صغيرة (Minor salivary glands) تتوضع في مناطق مختلفة من الحفرة الفموية، في الطبقة تحت المخاطية (Submucosal layer) كالغدد الشفوية (Labial)، واللسانية (Lingual) والخدية (Buccal) والحنكية اللسانية (Glossplatine) وخلف الرحوية (Retromolar) وتكون هذه الغدد الصغيرة ذات أقنية قصيرة تفتح مباشرة على سطح المخاطية[1] .

1.1.1. الغدة النكفية: Parotid gland

هي الأضخم بين الغدد اللعابية ولها جزءان، أحدهما سطحي يوجد تحت الجلد مباشرة أمام الأذن الخارجية، وجزء عميق خلف الرأد، ويتراوح وزنها بين (14– 28غ) وتخترقها فروع العصب الوجهي على نحوٍ صميمي، وتفتح قناتها المفرغة (قناة ستينون Stensen´s duct) على الخد إزاء الرحى العلوية الثانية، ويوجد أحيانًا جزء ملحق من نسيج الغدة مع القناة المفرغة إلى الأمام من جزئها السطحي[1].

2.1.1. الغدة تحت الفك: Submandibular gland

تتوضع في القسم الخلفي من الفم، حيث تعانق العضلة الضرسية اللامية من الخلف بمحاذاة الجزء المتوسط من عظم الفك السفلي، وتزن بين (10–15غ) أما قناتها المفرغة والمسماة بقناة وارتون (Wharton´s duct) فتنفتح على أرض الفم على جانبي اللسان[1].

3.1.1. الغدة تحت اللسان: Sublingual gland

هي الغدة الأصغر بين الغدد اللعابية الكبيرة، إذ تزن (2غ)، وتوجد في القسم الأمامي من الفم بين المخاطية الفموية والعضلة الضرسية اللامية، وتصل مفرزاتها إلى الحفرة الفموية عن

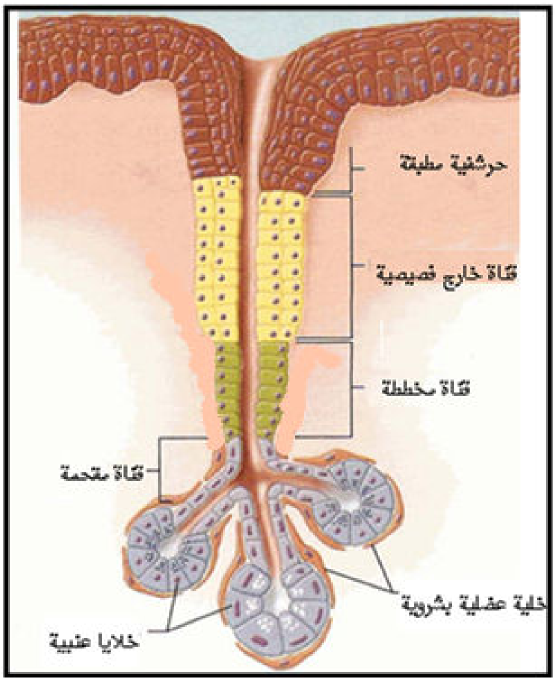
طريق أقنية صغيرة تسمى أقنية ريفينوس (Ducts of Rivinus) التي تفتح على جانبي الطية تحت اللسانية، وقد تفتح عبر قناة أضخم تسمى قناة بارثولين (Bartholin´s duct) التي تفتح مع قناة الغدة تحت الفك عند الحليمة تحت اللسانية (Sublingual caruncle) [1].

4.1.1. الغدد اللعابية الصغيرة: Minor salivary gland

يتراوح عددها بين (600–1000) وتوجد كتجمعات منفصلة في الطبقة تحت المخاطية، وذلك في عموم الحفرة الفموية باستثناء اللثة والقسم الأمامي من الحنك الصلب، وأغلبها من النوع المخاطي مع بضع استثناءاتٍ كغدد فون إبنر(Von Ebner´s glands) في اللسان، فإنها مصلية، وتفتح على الغؤورات حول الحليمات الكأسية[1].

2.1. لمحة نسيجية عامة عن الغدد اللعابية: Histology

تتألف الغدة اللعابية من عنباتٍ أو قطعٍ نهائية مفرزة أنبوبية أو كروية (Spherical or tubular secretory endpieces) تتصل بسلاسلٍ من الأقنية المتفرعة (Branched ducts)، مشابهة بذلك عنقود العنب وتفرعاته، حيث تشبّه الفروع بالأقنية، وحبات العنب بالعنبات. تتمادى لمعة العنبات مع الجزء الأولي من الجهاز القنيوي المسمى بالأقنية المخصورة (Intercalated ducts)، التي تتجمع لتشكل أقنيةً أضخم تسمى الأقنية المخططة (Striated ducts)، والتي تشكل معظم الجهاز القنيوي ضمن الفصيصي (Intralobule)، وتلعب دوراً رئيساً في تعديل اللعاب الأولي المفرز من العنبات، وتتجمع هذه الأقنية بدورها لتشكل الأقنية المفرغة بين الفصيصية (Interlobule)، والتي تتحد أيضاً لتشكل الأقنية المفرغة بين الفصية (Interlobe)، وتنتهي الأخيرة بالقناة المفرغة الرئيسة، التي تفتح على الحفرة الفموية، الشكل (1). وتوجد في بعض الغدد قنيّات بين خلوية (Intercellular Canaliculi) وهي عبارة عن امتدادات صغيرة من اللمعة توجد بين الخلايا المتجاورة، ومن المحتمل أن هذه القنيات تصل إلى قاعدة الخلايا المفرزة وتعمل على زيادة حجم السطح الإفرازي للخلايا[1،2،3].



الشكل (1) صورة ترسيمية توضح الوحدة الوظيفية في الغدة اللعابية، معدلة عن [13].

1.2.1. الخلايا المفرزة: Secretory cells

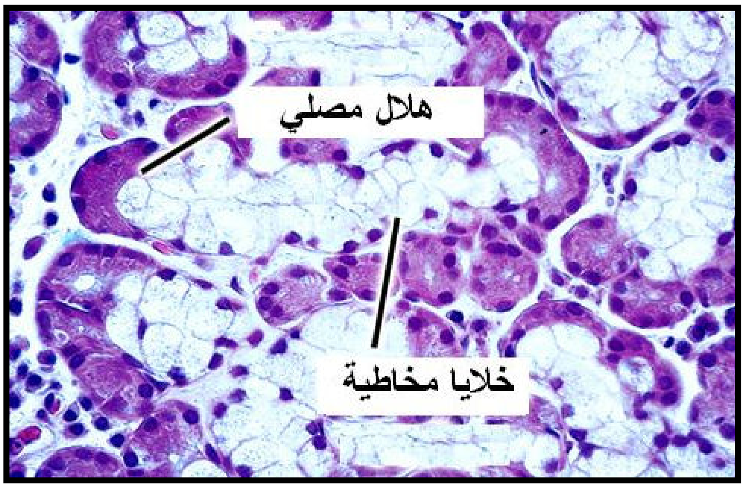
هناك نوعان رئيسيان من الخلايا المفرزة في الغدد اللعابية وهما:الخلايا المخاطية (Mucous cells) والخلايا المصلية (Serous cells) وتوجد بينهما فروقات في البنية والمظهر النسيجي، وفي نوع المكونات المنتجة منهما[1].

1.1.2.1. الخلايا المصلية: Serous cells

إن العنبات المصلية كروية الشكل وتتألف من (8–12) خلية تحيط بلمعة. وتكون الخلايا ذات شكلٍ هرمي، وتجاور قاعدتها العريضة اللحمة َالضامة، بينما تطلُّ قمتها الضيقة على اللمعة، وللمعة امتداداتٌ أصبعية ضيقة تمتد بين الخلايا المتجاورة لزيادة السطح الإفرازي تسمى (Intercellular canaliculi)، و تتوضع الأنوية الدائرية في الأجزاء القاعدية من الخلايا، أما الحبيبات الإفرازية فتوجد في القسم العلوي من هيولى الخلية وتفرز هذه الخلايا المصل[1،3].

2.1.2.1. الخلايا المخاطية: Mucous cells

إن العنبات المفرزة المخاطية ذات شكلٍ أنبوبيٍّ (Tubular) وتترافق في الغدد الكبيرة وبعض الغدد الصغيرة مع خلايا مصلية على شكل هلال (Demilune) يحيط بالخلايا المخاطية عند نهاية الأنبوب. وأهم ما يميز الخلايا المخاطية هو تجمع كميات كبيرة من المخاط في القسم العلوي من هيولاها، إذ تضغط على النواة والشبكة الهيولية بإتجاه قاعدة الخلية، وتظهر هذه المفرزات عديمة اللون في التلوين التقليدي وتتلون بشدة في كاشف شيف الدوري، وتتميز هذه الخلايا بجهاز كولجي ضخم يتوضع قاعديًا بالنسبة للحبيبات الإفرزية، ولا تحتوي الخلايا المخاطية على قنيات بين خلوية باستثناء الخلايا المحاطة بالهلال المصلي[3،1]، الشكل(2).



الشكل(2) صورة نسيجية تبين الخلايا المخاطية والمصلية في الغدة تحت الفك [1].

2.2.1. الجهاز القنيوي: Ductal system

إن الأقنية هي شبكةٌ من الأنابيب يزداد قطرها بدءاً من العنبات المفرزة وانتهاءً بالحفرة الفموية، وهناك ثلاثةُ أنواعٍ من الأقنية: الأقنية المخصورة (Intercalated duct)، والمخططة (Striated duct) والمفرغة (Excretory duct) [3،1].

1.2.2.1. الأقنية المخصورة: Intercalated duct

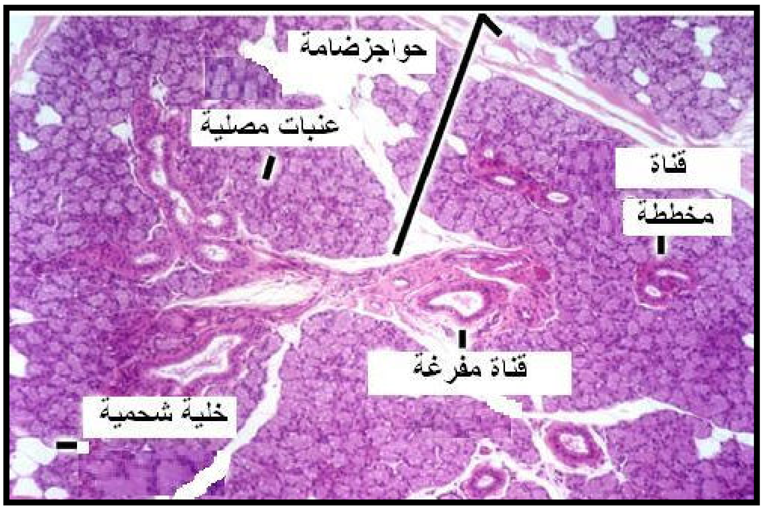
هي جزء يتصل مباشرة بالعنبات، تبطن ببشرة بسيطة مكعبة ذات نواة مركزية، تحيط بها الخلايا العضلية البشروية، قطرها أصغر من قطر الأجزاء المفرزة، إلا أن لمعتها أضخم، وتتحد عدة أقنية لتشكل أقنية أكبر [3،1].

2.2.2.1. الأقنية المخططة: Striated duct

تؤلف هذه الأقنية الجزء الأضخم من الجهاز القنيوي بين الفصيصي، خلاياها أسطوانية (columnar) ذات أنوية مركزية، وهيولاها أيوزينية باهتة وتشاهد التخطيطات في جزأها القاعدي، وقطرها ولمعتها أكبرمقارنة مع العنبات والأقنية المخصورة [3،1].

3.2.2.1. الأقنية المفرغة: Excretory duct

تتوضع هذه الأقنية في اللحمة الضامة بين فصيصات الغدة، وهي أكثر ضخامة في لمعتها وقطرها من الأقنية المخططة، وتبطن ببشرة رصفية مطبقة موهمة (Pseudostratified epithelium) ذات خلايا اسطوانية، كما تحتوي على خلايا قاعدية تتوضع على الصفيحة القاعدية لكنها لا تصل إلى اللحمة ، تتحد هذه الأقنية لتشكل أقنية مفرغة أكبر يزداد فيها عدد الخلايا القاعدية ، كما قد توجد الخلايا المخاطية (Goblet) فيها مبعثرة، وقد تصبح البشرة مطبقة في القناة المفرغة الرئيسية فيها التي تفتح على الحفرة الفموية [3،1]. انظر الشكل (3).



الشكل(3) صورة نسيجية توضح البنى المختلفة في الغدة النكفية [1].

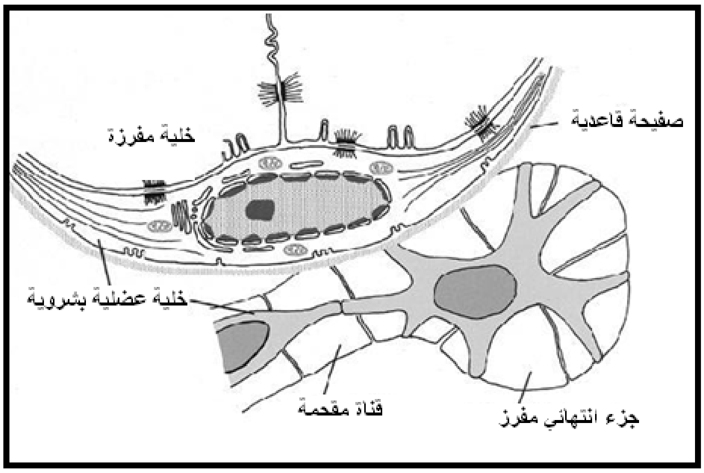
3.2.1. الخلية العضلية البشروية: Myoepithelial cell

هي خليةٌ تترافق مع الأجزاء المفرزة والأقنية المخصورة في الغدد اللعابية، تتوضع بين الصفيحة القاعدية وخلايا العنبات أو الأقنية، وتتصل بها عن طريق جسيمات الوصل، وتشبه الخلية العضلية الملساء، لكن يعتقد أنها من أصلٍ بشروي، وتمتلك الخلايا الموجودة حول العنبات شكلاً نجمياً، إذ تمتد تفرعاتٌ كثيرة من جسم الخلية لتحيط وتعانق الجزء المفرز، وتمتلئ هذه التفرعات بلييفات الأكتين و الميوزين، ويحتوي الغشاء الخلوي على فجوات كثيرة لها دورٌ في بدء التقلص، ويوجد العديد من المتعضيات الخلوية في الهيولى حول النواة، أما الخلايا حول الأقنية المخصورة فإنها أكثر مغزليةً وأقل تفرعاتٍ، وتمتد متطاولةً مع القناة. ويُعتقد أن التقلص يؤمن دعماً للأجزاء المفرزة خلال إفراز اللعاب، ويساعد الخلايا في إطراح اللعاب الأولي من الجزء المفرز إلى الجهاز القنيوي، وربما تعمل الخلايا المحيطة بالأقنية المخصورة على تقصيرها وتوسيعها لتؤمن انفتاحها، الشكل (5) [3،2،1].

إلا أنه هناك أبحاثٌ متعددة تبين أن لهذه الخلية وظائف أخرى أهم من التقلص، إذ تلعب هذه الخلية دوراً هاماً أثناء التطور الجنيني للغدة اللعابية يساهم في إعطاء الغدة شكلها المتفرع (Branching morphogensis) كما تعزز تمايز الخلايا البشروية وتحافظ على استقطابها، ولذا فهي تحافظ على الهندسة النسيجية للعنبات[4،1]، وتبذل الخلية تأثيرًا نظير صماوي مضاداً للغزو (Paracrine anti-invasive effect) وذلك بتعزيز كلٍّ من التمايز البشروي (Epithelial differentiation) واصطناع الغشاء القاعدي (Synthesis of basement membrane) وبإفراز كلٍّ من كابحات حالات البروتين (Proteinase inhibitor) وكابحات تكون الأوعية (Inhibiting angiogenesis)[5،4،1]، كما تعدّل الخلية من إنتاج الخلايا السرطانية والخلايا المصورة لليف لأنزيمات القالب العضوي المعدنية (Matrix metalloproteinases)[4]. وقد وجد الباحثون أن الخلية العضلية البشروية في الثدي لها المواصفات نفسها التي تتمتع بها نظيرتها في الغدد اللعابية.[7،6] ونتيجة لهذه الخصائص المتعددة والمتميزة، فقد أُطلق على الخلية العضلية البشروية (لقب الخلية الكابحة للورم (Tumor suppressor cell [7،6،5،4].

وقد أجمل هذا الدور في الوظائف التالية :

- اصطناع الغشاء القاعدي وترميمه: إذ تنتج اللامنين والكولاجين IV [8،4].
- الحث على التخلق البشروي (Epithelial morphogenesis):إذ تفرز عوامل النمو والستوكينات كعامل النمو المصور لليف الأساسي (Basic fibroblast GF)، وعامل النمو التحولي ألفا (Transforming growth factor a)، والانترلوكين6 [7،4،1].
- تخزين القالب العضوي فهي تنتج الكولاجين الخلوي والبروتيوغليكان[8،4].
- تعدل من إنتاج الخلايا السرطانية والخلايا المصورة لليف لإنزيمات القالب العضوي المعدنية (Matrix Metalloproteinases) [8،4].
- تنتج وتخزن كمياتٍ كبيرةٍ من كابحات الورم، وكابحات حالات البروتين (البروتيناز)، فهي تفرز كميات كبيرة من ال(Maspin) وهو كابح للنمو والغزو الورمي[6،5،4].
- إفرازها المنخفض للأنزيمات المخرّبة للقالب العضوي[4].
- تكبح تكوّن الأوعية[6،4،1].
- أورامها حميدة ونادرة، ونادراً ما تتحول للخباثة، وإن تحولّت فإنّ خباثتها منخفضة[8،4].



الشكل (4) صورة ترسيمية توضح توضع الخلية العضلية البشروية [1].

4.2.1. النسيج الضام: Connective tissue

يتألف النسيج الضام من المحفظة التي تحيط بالغدة اللعابية من الخارج وتفصلها عن النسج المجاورة، وتمتد من هذه المحفظة حواجز ضامة تقسم الغدة إلى فصوص وفصيصات، تحتوي هذه الحواجزعلى الأعصاب والأوعية الدموية التي تغذي البرانشيم الغدي، إضافة إلى الأقنية المفرغة[1]...

3.1. البنية النسيجية لكل غدة لعابية.

1.3.1. البنية النسيجية للغدة النكفية: Histology of parotid gland

إن الأجزاء المفرزة في الغدة النكفية هي من النوع المصلي، وغالباً ما نشاهد النسيج الشحمي في الغدة، تتميز الأقنية المخصورة هنا بكثرتها وطولها مقارنة مع الغدة تحت الفك، تبطن بخلايا مكعبة وتكون اللمعة هنا أضخم من لمعة العنبات، وتوجد نوى الخلايا العضلية البشروية على السطح القاعدي للأقنية. والأقنية المخططة في الغدة أيضا كثيرة، وتكون على شكل أنابيب طولية أو دائرية ذات لون حمضي خفيف، وقطرها أضخم من قطر العنبات، تتألف من بشرة أسطوانية و أنويتها دائرية مركزية[3،1].

2.3.1. البنية النسيجية للغدة تحت الفك: Histology of submandidular gland

تحتوي هذه الغدة على الأجزاء المفرزة المصلية وعلى أنابيب مخاطية محاطة بهلال مصلي، لذا فهي غدة مختلطة، إلا أن الخلايا المصلية أكثر عدداً، وتشبه مثيلاتها في الغدة النكفية، أما الهلال المصلي فبنيته تشبه أيضاً بنية الأجزاء الإفرازية المصلية، إلا أنه يفرغ محتوياته من خلال القنيات بين الخلوية الصغيرة والتي تمتد بين الخلايا المخاطية لتتصل مع اللمعة الأنبوبية، أما الأقنية المخططة فإنها هنا أقل عدداً من مثيلاتها في النكفة إلا أن لها البنية نفسها[3،1].

3.3.1. البنية النسيجية للغدة تحت اللسان: Histology of sublingual gland

هي أيضاً غدة مختلطة إلا أن الخلايا المخاطية هي المسيطرة، وتكون الأقنية المخصورة صغيرة وصعبة التمييز، والأقنية الفصيصية أقل عدداً من النكفة وتحت الفك[3،1].

4.3.1. البنية النسيجية للغدد الصغيرة: Histology of minor salivary gland

تتألف من تجمعات من الأجزاء المفرزة والأقنية، تتوضع في بنى شبه فصيصية في الطبقة تحت المخاطية أو بين الألياف العضلية في اللسان، وتفتح مباشرة على السطح المخاطي، إن الأجزاء المفرزة عموماً مخاطية أو تملك جزءاً مصلياً صغيراً [3،1].

2. أورام الغدد اللعابية: Salivary gland tumors

1.2. لمحة عامة: Overview

تمتاز الأورام الناشئة على حساب الغدد اللعابية بتنوعها الواسع، ومظاهرها النسيجية الأكثر تعقيداً واختلافاً من أي عضوٍ آخر في الجسم، ويوجد هذا التنوع النسيجي حتى ضمن الورم نفسه، مما يجعل هذه الأورام تشكل تحدياً صعباً من حيث التشخيص والمعالجة. ومما يزيد في صعوبة التشخيص أيضاً ندرة بعضها، وانعدام التمايز ونزوع بعض الأورام الحميدة منها إلى التسرطن، ولسوء الحظ فإنّ هذه التبدلات الشكلية قد انعكست أيضاً على التلوينات المناعية أيضاً مما جعل فائدتها محدودة في تشخيص هذه الأورام [9].

إنّ أورام الغدد اللعابية غير شائعةٍ عموماً، حيث يتراوح معدل حدوثها السنوي (Annual incidence) حسب تصنيف منظمة الصحة العالمية لعام 2005 بين (0.4–13.5) في الـــ100000، كما تراوحت الأورام الخبيثة منها بين (0.4–2.6) في 100000، وشكلت هذه الأورام نسبة (6%) من أورام الرأس والعنق[10]. ومعظم أورام الغدد اللعابية هي أورام حميدة وتبلغ نسبتها (80%)، أما سرطاناتها فهي نادرة وتشكل أقل من (0.5%) من خباثات الجسم، وحوالي (5%) من سرطانات الرأس والعنق[11]. و في الجدولين التاليين تلخيصٌ لأربع سلاسل ضخمة من الدراسات الوبائية، أجراها عدة باحثين، تبين هذه الجداول نسبَ توزع الأورام على الغدد اللعابية المختلفة، كما توضح نسبَ الأورام الخبيثة في كل غدة إلى عموم أورامها[12]. حيث ينشأ معظم هذه الأورام في الغدة النكفية بنسبة (64–80%) من جميع الحالات، وبلغت نسبة السرطانات بين أورامها عموماً (15–32%). تلتها الغدد اللعابية الصغيرة، حيث كانت نسبة حدوث الأورام فيها (9–23%) من جميع الأورام، وكان (46–82%) من أورامها خبيثاً. تلتها الغدة تحت الفك (8–11%) من جميع الأورام وبلغت

سرطاناتها ضعف سرطانات النكفة تقريباً (37–45%). وأقل من (1%) من الأورام تنشأ في الغدة تحت اللسان، بينما كان (70–90%) من أورامها خبيثاً. ولا نعلم مدى تطابق هذه الوبائيات مع واقعنا لعدم وجود دراسات وبائية تخصنا.

الجدول(1) يبين نسبَ توزع أورام الغدد اللعابية البشروية الأولية على الغدد اللعابية[12].

المؤلف (السنة)	عدد الحالات	النكفة	تحت الفك	تحت اللسان	غدد صغيرة
Eveson and Cawson (1985)	2.410	%73	%11	%0.3	%14
Seifert et al.(1986)	2.579	%80	%10	%1.3	%9
Spiro (1986)	2.807	%70	%8	مشمولة مع الغدد الصغيرة	%22
Ellis et al. (1991)	13.749	%64	%10	%0.3	%23

الجدول(2) يبين نسبَ الأورام الخبيثة إلى جميع الأورام في كل غدة[12].

المؤلف (السنة)	عدد الحالات	النكفة	تحت الفك	تحت اللسان	غدد صغيرة
Eveson and Cawson (1985)	2.410	%15	%37	%86	%46
Seifert et al. (1986)	2.579	%20	%45	%90	%45
Spiro(986)	2.807	%25	%43	مشمولة مع الغدد الصغيرة	%82
Ellis et al. (1991)	13.749	%32	%41	%70	%49

2.2. منشأ الأورام في الغدد اللعابية: Histogenesis of salivary gland tumors

إن نشوء الأورام اللعابية مثيرٌ للجدل، فهناك من يقول بوجود خلايا جذعية (Stem cell) أو احتياطية ضمن الجهاز القنيوي، وهي المسؤولة عن نشوء الأورام، بينما يرى آخرون أن الخلايا العنبية و الأقنية المخصورة قادرة على تشكيل الأورام أيضاً [13،14،15]، وأنَّ النسيجية المعقدة للأورام اللعابية تعود في جزءٍ منها إلى تورط أكثر من خلية، قد تكون عنبية أو قنيوية أو قاعدية أو حرشفية أو عضلية بشروية[13،14]. وإضافة إلى ذلك التنوع فإن القالب العضوي من الأجزاء الملفتة للنظر في عدة أورام، ويشتمل على مواد الغشاء القاعدي وألياف الكولاجين أو المرنين أو الغلكوزأمينوغليكانات، ويعتقد أن هذه المواد كلها تفرز من قبل الخلية العضلية البشروية [13].

وقد وُضعت نظريتان لتفسير التنوع النسيجي في أورام الغدد اللعابية ومحاولة فهمه، وهما نظرية الـــ (Bicellular theory) ونظرية الـــ (Multicellular theory)، حيث تفترض النظرية الأولى نشوءَ أورام الغدد اللعابية من الخلايا القاعدية الموجودة في الأقنية المفرغة والمخصورة، ومن الأورام التي تنشأ من خلايا الأقنية المفرغة السرطان شائك الخلايا (Squamous cell carcioma) والسرطان المخاطي المشبه بالبشروي (Mucoepidermoid carcinoma)، بينما تعطي الخلايا الجذعية الموجودة في القناة المخصورة الورم الغدي المتعدد الأشكال (Pleomorphic adenoma)، والسرطان الكيسي المشبه بالغدي (Adenoid cystic carcinoma)، والسرطان عنبي الخلايا (Acinic cell carcinoma)[16].

أما النظرية الثانية فتقول بنشوء الأورام من الخلايا المتمايزة نفسها ضمن الوحدة الغدية، فالأقنية المخططة تعطي الأورام ذات الخلايا المنتبجة (oncocytic)، والخلايا العنبية تعطي السرطان عنبي الخلايا، وخلايا القناة المفرغة تعطي السرطان شائك الخلايا والسرطان المخاطي المشبه بالبشروي، أما الأورام المتعددة الأشكال فتنشأ على حساب الأقنية المخصورة والخلايا العضلية البشروية [17].

3.2. دور الخلية العضلية البشروية في أورام الغدد اللعابية:

The role of myoepithelial cells in salivary gland tumors.

تعد الخلية العضلية البشروية شريكاً خلوياً مفتاحياً في عمليات التكون الشكلي (Morphogenitic) المسؤولة عن المظاهر النسيجية المتنوعة للعديد من أورام الغدد اللعابية، لما تبديه هذه الخلية من تنوعٍ في أشكالها وفي قالبها العضوي الذي تفرزه[18]، وقد أُثبت تأثيرها في أنماطٍ مختلفةٍ من أورام الغدد اللعابية من حيث الإمراضية والسلوك الحيوي[19]، وإن الأدلة متزايدةٌ على تأثيرها الدفاعي في الأورام الخبيثة، إذ تنتج هذه الخلايا في الأورام الحاوية عليها كابحات البروتيناز مثل(Maspin, nexin II, a1-antitrypsin, TIMP-1) وهي عوامل مضادة للغزو[4،5،6،8]، ومن المسلم به الآن أن الأورام الناشئة عن الخلايا العضلية البشروية أقل عدوانية، فالسرطان العضلي البشروي مثلاً يميل إلى التفصص أكثر من الارتشاح أي يكون نمط نموه عقيدياً (Nodular growth pattern)، كما أن المرضى المصابين به يعيشون أكثر مقارنة مع المصابين بسرطاناتٍ لا تبدي تمايزاً عضلياً بشروياً[20]،

إضافة إلى صفاتها المميزة المذكورة سابقاً وعلى رأسها كبح تكون الأوعية، كما أن وظيفتها في دعم البرانشيم الغدي وتمايزه، وفي إنتاج وترميم مواد الصفيحة القاعدية، كاللامينين، والفبرونكتين، والكولاجين، إن هذه الوظيفة لها دورٌ هامٌ في التحولات الورمية والتكاثرية[19،4]، فقد وجد الباحثون في سرطان الثدي مثلاً أن هناك تناسباً عكسياً بين التسرطن وقلة إنتاج الخلية العضلية البشروية للامينين، أو فقدانه[21].

إنّ وجود الخلية العضلية البشروية في الأورام متباين بشدة، إذ يتراوح من وجودٍ قليلٍ كما في الأورام الغدية وحيدة الشكل (Monomorphic adenomas)[18] إلى وجودٍ غزيرٍ كما في الأورام العضلية البشروية (Myoepitheliomas)[22]، فدورها مؤكدٌ في الورم الغدي المتعدد الأشكال وهو الورم الأكثر شيوعاً في الغدد اللعابية، ويعتقد أن هذه الخلية تلعب دوراً جوهرياً فيه وذلك من خلال التعبير عن البنى الضامة والبشروية[23]، أما في الأورام الخبيثة فقد وجدت في السرطان البشروي- العضلي البشروي (Eipthelial-myoepithelial carcinoma) والسرطان الغدي القاعدي (Basal cell adenocarcinoma) وفي السرطان الكيسي المشبه بالغدي (Adenoid cystic carcinoma)، والسرطان الغدي المتعدد الأشكال منخفض الدرجة (Polymorphous low-grade adenocarcinoma)[19،18]، وفي السرطان المخاطي المشبه بالبشروي (Mucoepidermoid carcinoma)[25،24،23]، كما في الجدول (3).

وتنتج الأنماط الشكلية المعقدة والمتنوعة للأورام الحاوية على تمايز عضلي بشروي من مرونة الخلية العضلية البشروية وقدرتها الهائلة على التمايز إلى أشكال خلوية متعددة (Cytologic differentiation)، وما تبديه أيضاً من قدرةٍ على الارتصاف والتجمع ضمن أنماط نسيجية متعددة (Architectural patterns)[27،26،22]، إضافة إلى مفرزات القالب العضوية الغزيرة التي تفرزها في سياق الأورام (Extracellular matrix production)[8،4]، ولذا فإن التداخل بين هذه النواحي الثلاث هو الذي يؤدي إلى تلك الأشكال المتعددة في الأورام كما يلي:

1.3.2. مفرز القالب العضوي: Extracellular matrix production[8،4]

تفرز الخلية العضلية البشروية مكونات الغشاء القاعدي في الحالة الطبيعية وتخزنها، ويبدو أنه مع التحول الورمي تزداد القدرة على الاصطناع مما يؤدي إلى إنتاج كميات كبيرة من مواد الغشاء القاعدي، ومواد القالب العضوي الأخرى كالغليكوزأمينوغليكانات، وأكثر هذه المواد هو الغضروفين سلفات الذي يظهر كمادة غضروفية مخاطية بلون أزرق رمادي، والمادة المفرزة الأخرى هي مادة زجاجية أيوزينية، تمثل اللامينين والكولاجينIV ، وهما من مواد الغشاء القاعدي، إضافة إلى النمطين الأول والثاني من الكولاجين والفبرونكتين، وهي من مواد القالب العضوي الخلالي.

2.3.2. التمايز الخلوي: Cytologic differentiation[27،26،22]

تتمايز الخلية العضلية البشروية في الأورام إلى أشكالٍ متعددة تتلخص فيما يلي:

- خلايا نجمية أو مشبهة بالمخاطية (Stellate or Myxoid cells) توجد في المناطق الغضروفية المخاطية في الورم الغدي متعدد الأشكال.
- خلايا مغزلية أو مشبهة بالعضلية (Spindle-shaped or Myoid cells) توجد في الورم الغدي متعدد الأشكال والأورام العضلية البشروية.
- خلايا شبه قاعدية (Basaloid cells) تشاهد حول الأقنية غالباً كما في الورم الغدي متعدد الأشكال والسرطان الكيسي المشبه بالغدي، وتصطبغ أنويتها بشدة وهيولاها قليلة.
- خلايا شبه بشروية (Epithelioid cells): خلايا مضلعة ضخمة (Polygonal) ذات أنوية حويصلية (Vesicular) وهيولاها غزيرة.
- خلايا رائقة (Clear cells) توجد في عدة أورام لعابية على شكل أعشاش أو على السطح الداخلي للأقنية أو البنى شبه الغدية، كما في السرطان البشروي – العضلي البشروي .
- خلايا زجاجية أو مشبهة بالهيولية (Hyaline or Plasmacytoid cells) وتشاهد أيضاً في الورم الغدي متعدد الأشكال والورم العضلي البشروي.

3.3.2. الأنماط النسيجية: Architectural patterns [27،26،22]

تعتمد الأشكال النسيجية التجمعية على التمايز الخلوي، وعلى نمط القالب العضوي المرتبط به وكميته وهي:

- كيسي كاذب (Pseudocystic) فراغات كيسية (Microcystic) بأحجام مختلفة ضمن أعشاش من الخلايا الورمية تحتوي على مادة شبه مخاطية أو زجاجية.
- غدي كاذب (Pseudoglandular) تجمعات من خلايا شبه بشروية تشكل بنى واسعة ولمعاتٍ كاذبة (Pseudo-lumens) مع قالب عضوي شبه مخاطي.
- شبه مخاطي(Myxoid) تتبعثر فيه الخلايا الورمية عشوائياً ضمن لحمة مخاطية غضروفية غزيرة.
- صلد(Solid) على شكل ٍأعشاشٍ وصفائح من الخلايا تتخللها لحمة ليفية أو زجاجية محدودة.
- شبكيّ (Reticular) حبال متشابكة من خلايا شبه بشروية، على شكل نوافذ تمتلئ بالمادة المخاطية.

4.2. التلوين المناعي للخلية العضلية البشروية في سياق الأورام:

Immunohistochemical profile of neoplastic myoepithelial cell .

من الصعب تحديد الخلية العضلية البشروية في مقاطع الهيماتوكسلين – أيوزين التقليدية [3]. ولأنّ هذه الخلية تمتاز بخصائص بشروية وضامة من حيث الشكل والوظيفة[19]، فقد انعكس ذلك على تلوينها المناعي، فهي تعبر عن طيفٍ واسع ٍ من الملونات المناعية، وقد تكون الوحيدة في الفم والفكين التي تعبر معاً عن السيتوكيراتينات (Cytokeratins) والفايمنتين (vimentin) و(S100) و(Calponin) و(P63) و(CD109) والواسمات العضلية الملساء (Smooth muscle markers) كالأكتين والميوزين[30،29،28،19،18]، وتختلف إيجابية هذه الملونات من ورم ٍلآخر، بل قد تختلف إيجابيتها ضمن الورم الواحد[31،30]. ويُعد الأكتين من أفضل الواسمات المناعية التي تحدد الخلية الطبيعية والورمية [33،32،30].

الجدول (3) يبين التمايز العضلي البشروي في أورام الغدد اللعابية[18].

أورام	لا يوجد تمايز عضلي بشروي	وجود جزئي	وجود مسيطر
حميدة	الورم القنيوي الغدي ورم وارتون الورم الغدي المحب للحمض الورم الغدي الزهمي الورم الحليمي القنوي الورم الغدي الكيسي	الورم الغدي قاعدي الخلايا	الورم الغدي متعدد الأشكال. الورم العضلي البشروي.
خبيثة	السرطان الغدي عنبي الخلايا السرطان شائك الخلايا السرطان الغدي الكيسي السرطان ذو الخلايا الحمضة سرطان القناة اللعابية السرطان الغدي الزهمي السرطان الغدي المخاطي السرطان الغدي رائق الخلايا السرطان الغدي غير المتمايز	السرطان الغدي قاعدي الخلايا. السرطان الغدي الكيسي المتعدد الأشكال منخفض الدرجة. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي.	السرطان الكيسي المشبه بالغدي. السرطان البشروي- العضلي البشروي. السرطان العضلي البشروي. السرطان الناشئ عن الورم الغدي متعدد الأشكال.

3. الأورام المشمولة في البحث: Tumors of Research

لقد شمل البحث السرطانين الأوليَيَين من حيث التواتر في الغدد اللعابية وهما السرطان المخاطي المشبه بالبشروي والسرطان الكيسي المشبه بالغدي، ولم نتمكن من الحصول على بقية السرطانات لندرتها وقد يكون للصعوبة التشخيصية دورٌ في هذه الندرة.

1.3. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي: Mucoepidermoid carcinoma

1.1.3. الوبائيات: Epidemiology

هو السرطان الغدي اللعابي الأكثر شيوعاً عند البالغين والأطفال، وله مجال "عمريٌّ واسع يمتد من العقد الثاني وحتى السابع (متوسط عمر المرضى 45 سنة)، ويميل إلى إصابة النساء أكثر بمعدل (2:3) [34]. يشكل هذا الورم 10% من أورام الغدد اللعابية وأقل من 5% من سرطانات الرأس والعنق [35]. ويحدث نصف الأورام تقريباً (53%) في الغدد الكبرى [34].

وتأتي النكفة في المرتبة الأولى (70%) وبعدها الغدد اللعابية الصغرى (15–20%) خصوصاً الحنك، ومن ثم الغدة تحت الفك (6–10%)[13]. أما الغدة تحت اللسان فتباينت النسب من (1%) في تصنيف منظمة الصحة العالمية إلى (2–4%) في مراجع أخرى [35].

2.1.3. سريرياً: Clinical features

تظهر معظم الأورام كانتباج قاسٍ غير مؤلمٍ، وعندما تكون الأورام بطيئة النمو، فإنها تكون منخفضة درجة الخباثة، ولا تغزو إلا في مراحل متأخرة، ولا تتقرح إلا بعد فترات طويلة، وكثيراً ما يذكر المريض وجود كتلةٍ من 3–6 سنوات سابقة. وعندما تنمو وتنتشر بسرعة، وتتقرح مبكراً فإنها تكون متوسطة درجة الخباثة أو عاليتها، ويرافق الألم بعضها، وتتظاهر ككتلةٍ صلدةٍ تغطيها بشرة طبيعية أو متقرحة [35].

3.1.3. عيانياً: Macroscopy

يختلف المظهر العياني حسب درجة الورم أيضاً، تكون الأورام منخفضة الدرجة على شكل كتلٍ واضحة الحدود رغم أنها دون محفظة، يتراوح قطرها من (2–4 سم)، وتتمازج فيها المناطق الصلدة بالكيسية، وتتشابه معها الأورام متوسطة الدرجة لكنها تفتقد إلى المناطق الكيسية. أما الأورام عالية الدرجة فحدودها مرتشحة وغير واضحة ولا تحتوي على مناطق كيسية [35].

4.1.3. نسيجياً: Histopathology

يعتمد السلوك الحيوي لهذه الأورام على النمط النسيجي، حيث يتراوح سلوكها بين الخباثة المنخفضة جداً إلى العالية جداً.تشاهد في هذا السرطان عدة أنواع من الخلايا:

- خلايا مخاطية (Mucous cells):خلايا ضخمة، وهيولاها رغوية شاحبة، وتظهر مجتمعة أو مفردة، أو تبطن الأجواف الكيسية.
- الخلايا البشروية (Mucoepidermoid cells): خلايا مضلعة، هيولاها أيوزينية غزيرة قد تظهر بينها جسيمات الوصل، ونادراً ما يشاهد القرنين، تظهر على شكل صفائح (Sheets) أو تبطن الأجواف الكيسية ولكن بدرجة أقل من الخلايا المخاطية.

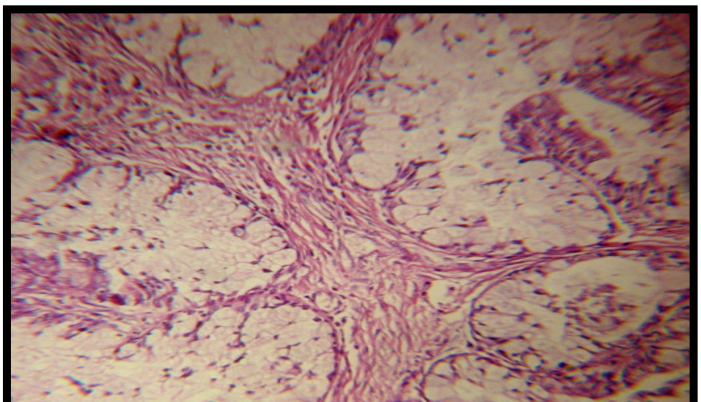
- الخلايا المتوسطة (Intermediate cells): خلايا شبه قاعدية (Basaloid) تتنوع في حجمها من خلايا صغيرة مصطبغة بشدة إلى خلايا أضخم أقرب إلى الخلايا الحرشفية، وأيضاً تتجمع في صفائح أو تبطن الأجواف الكيسية، حيث تشكل البطانة المطبقة للأكياس وتوجد تحت الخلايا المخاطية المطلة على اللمعة، ويعتقد البعض انها تتمايز إلى النمطين السابقين [13،34].
- خلايا رائقة (Clear cells): تظهر على شكل صفائح واسعة أو توجد مفردة أو عناقيد ضمن الخلايا الحرشفية ولكن لاتشاهد دائماً [13].

يصنف الورم إلى ثلاث درجات نسيجية اعتماداً على كمية التشكل الكيسي ودرجة الشذوذ الخلوي ونسب الخلايا الثلاث إلى بعضها [12]. وهي:

1.4.1.3. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي منخفض درجة الخباثة:

Low-grade Mucoepidermoid carcinoma

تشاهد فيه أكياس ضخمة تحتوي المخاط وتبطن بمزيج من الخلايا الحرشفية والمتوسطة والمخاطية، وقد تشكل هذه الخلايا بؤراً صلدة كثيرة بين الأكياس، وتكون الخلايا متمايزة ولا تبدي شذوذاً خلوياً أو فعالية انقسامية، ولا يوجد غزو للعصب، وقد تتمزق الأكياس وتحرر المخاط مسببةً رد فعل التهابي ضمن النسج المجاورة، كما أن التمزق يسهل انتشار الخلايا الورمية، ويملك الورم هنا كمية أكبر من الخلايا المخاطية، وتندر الأعشاش الصلدة من الخلايا المتوسطة و البشروية[13]. الشكل(5).



الشكل(5) السرطان المخاطي المشبه بالبشروي منخفض الدرجة(الصورة من عينة البحث).

2.4.1.3. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي متوسط درجة الخباثة:

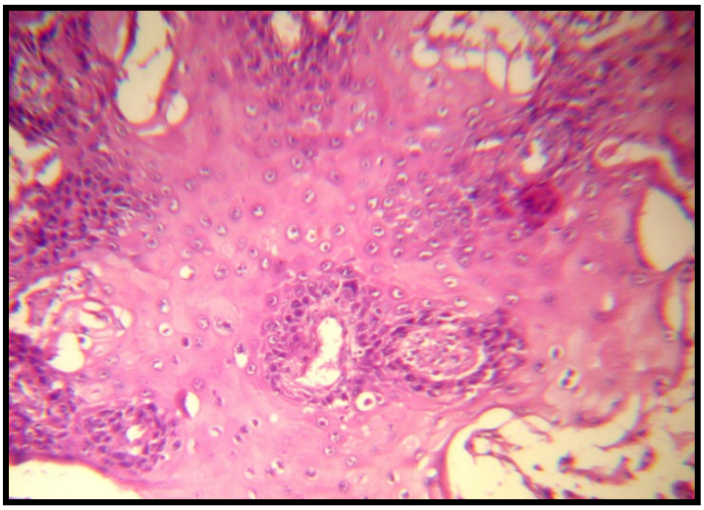
Intermediate - grade Mucoepidermoid carcinoma

تكون الأكياس أصغر وأقل ويغلب النمط الصلد، ويتألف من خلايا حرشفية ومتوسطة وبعض الخلايا المخاطية المتناثرة، ولاتوجد الانقسامات عادة، وقد يشاهد شذوذ خلوي وتعددية شكلية، ونادراً ما يوجد غزوٌ عصبيٌّ، ولكن نشاهد ارتشاحاً في النسيج الغدي المجاور [13].

3.4.1.3. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي عالي درجة الخباثة:

High - grade Mucoepidermoid carcinoma

يكون صلداً والأكياس نادرة وصغيرة، ويتألف من خلايا حرشفية ومتوسطة ويكون الشذوذ الخلوي واضحاً، كما تشاهد الانقسامات بسهولة، والخلايا المخاطية نادرة جداً، وتكون هذه الأورام مرتشحة وغير محاطة بمحفظة، وهنا قد نشاهد الغزو حول العصب، وقد تشاهد الخلايا الرائقة في جميع درجات الورم وأحياناً تغلب على معظم الورم وهنا يجب تفريقه عن أورام الخلايا الرائقة.[13،35] الشكل(6).



الشكل(6) السرطان المخاطي المشبه بالبشروي عالي الدرجة،
تظهر فيه تجمعات الخلايا البشروية(من عينة البحث).

2.3. السرطان الكيسي المشبه بالغدي: Adenoid cystic carcinoma

1.2.3. الوبائيات: Epidemiology

هو السرطان الغدي اللعابي الثاني شيوعاً، إذ يشكل(10%) من أورام الغدد اللعابية البشرية و(20%) من سرطاناتها [35]. يشيع حدوثه في الغدد اللعابية الصغيرة بنسبة (50–60%) من الحالات، وتتوزع النسبة الباقية بالتساوي بين النكفة وتحت الفك[12]، أما نسبة الورم إلى باقي أورام كل غدة فقد بلغت (2–3%) من أورام النكفة، و(12–17%) من أورام الغدة تحت الفك، وهو السرطان الأكثر شيوعاً فيها [12]، و(30%) من أورام الغدد الصغيرة[35] أغلبها في الحنك، ومن ثم اللسان، فالشفاه، فقاع الفم[36]. أما نسبته إلى سرطانات كل غدة، فالنسبة المقبولة عالمياً هي: (12–15%) من سرطانات النكفة و(30–60%) في الغدة تحت الفك، و(35–55 %) من سرطانات الغدد اللعابية الصغيرة [35].

2.2.3. سريرياً: Clinical features

يتظاهر هذا السرطان ككتلةٍ تنمو ببطء، ويعدُّ الألم عرضاً هاماً وشائعًا لهذا السرطان لخاصيته في غزو العصب، و يحدث أحياناً مبكراً حتى قبل ظهور الانتباج [12].

3.2.3. عيانياً: Macroscopy

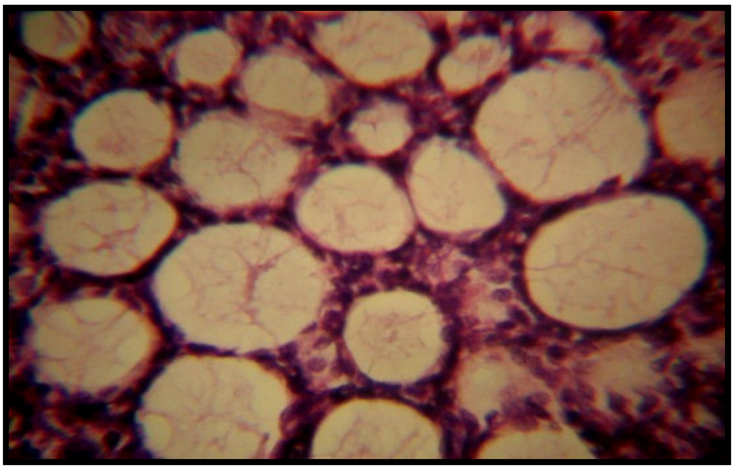
كتلة قاسية سمراء لامعة ذات أحجامٍ مختلفة ويكون الورم صلداً أكثر منه كيسياً، حدوده واضحة، لكنه غير محاط بمحفظة[36].

4.2.3. نسيجياً: Histopathology

يتألف السرطان من مزيج من الخلايا القنيوية (Ductal) والخلايا العضلية البشروية (Myoepithelial)، التي تتنوع في اصطفافها. ويلاحظ فيه ثلاثة أنماطٍ نسيجية رئيسية وهي: الغربالي (Cribriform)، والأنبوبي (Tubular)، والصلد(Solid) وقد تترافق الأنماط الثلاثة عادة في المريض الواحد، إلا أن تصنيف الورم يكون تبعاً للنمط المسيطر. ولحمة الورم عموماً زجاجية كثيفة وقد تكون شبه مخاطية (Myxoid) [12].

1.4.2.3. الغربالي: Cribriform pattern

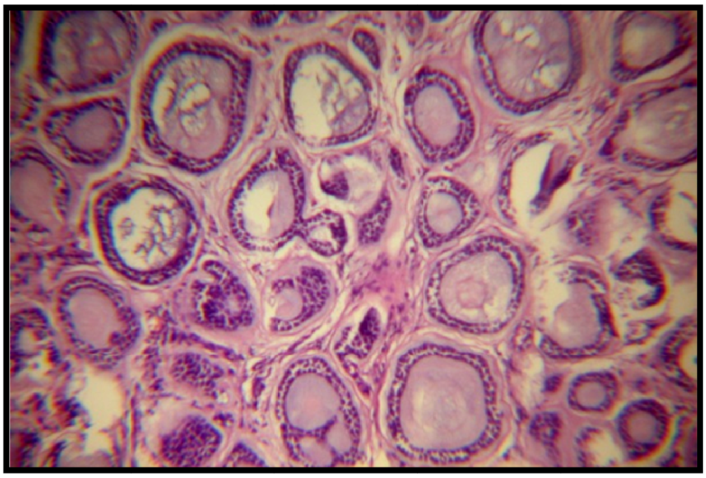
وهو الأكثر شيوعاً، والأسهل تمييزاً، ويتألف من جزر من الخلايا البشرية شبه القاعدية التي تحتوي على فراغات كيسية أسطوانية متعددة تُشبّه بمنظر الغربال أو الجبنة السويسرية (Swiss cheese)، وتحتوي هذه الفراغات على مادة شبه مخاطية محبة للأساس (Basophilic mucoid material)، أو منتج أيوزيني زجاجي (Hyalinizd esinophilic product)، أو مظهر زجاجي شبه مخاطي مشترك (Mucoid-hylinized). وأحياناً تحيط المادة الزجاجية بجزر الخلايا الورمية أو تظهر الخلايا الورمية على شكل حبال صغيرة مندمجة ضمن لحمة زجاجية، وتكون الخلايا الورمية مكعبة وصغيرة، أنويتها محبة للأساس بشدة وهيولاها قليلة، والفعالية الانقسامية قليلة[12]. الشكل(7).



الشكل(7) يوضح النمط المثقب (من عينة البحث).

2.4.2.3. الأنبوبي: Tubular

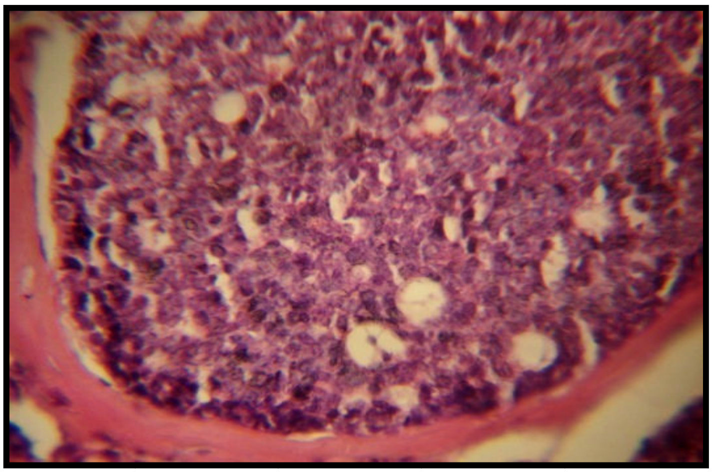
تشبه الخلايا هنا مثيلاتها في النمط الغربالي، لكنها تصطف على شكل أقنية صغيرة متعددة، أو أنابيب ضمن لحمة زجاجية، ويمكن أن تبطن هذه البنى بطبقة أوعدة طبقات من الخلايا وأحيانًا تشاهد طبقة من الخلايا البشرية وطبقة من الخلايا العضلية البشرية[12]. الشكل(8).



الشكل(8) يوضح النمط الأنبوبي (من عينة البحث).

3.4.2.3. الصلد: Solid

يتألف من جزر وصفائح من الخلايا الورمية التي تبدي قابلية أقل لتشكيل الأكياس والأقنية، ويشاهد في هذا النمط تعدد الأشكال الخلوية، والفعالية الانقسامية إضافة إلى التموت في مركز الورم، وهذا النمط هو الأسوأ إنذاراً[12]. الشكل(9). ويتميز هذا الورم بالغزو حول العصب (Perineural invasion) وضمنه (Intraneural) وهذا ما يسبب شلل العصب الوجهي أو تشوش الحس [36].



الشكل(9) يوضح النمط الصلد (من عينة البحث).

4. الفعالية التكاثرية: Proliferative activity

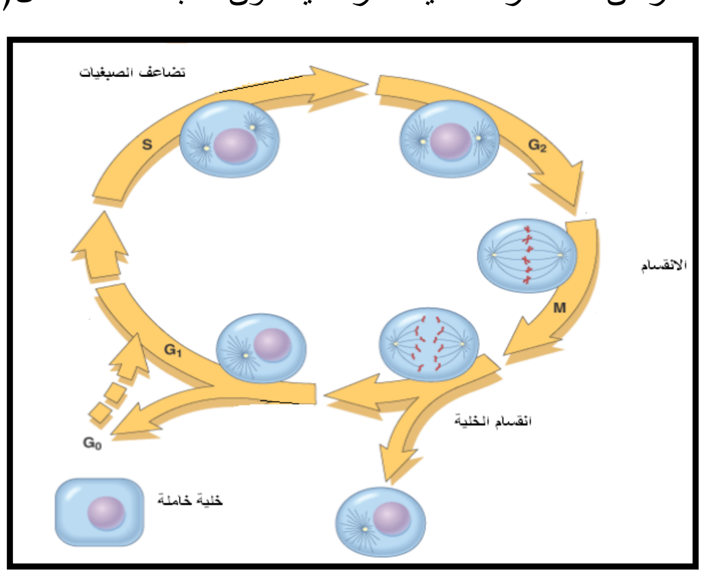
لدراسة فعالية التكاثر عند خليةٍ ما لابدَّ من لمحةٍ بسيطةٍ عن دورة انقسام الخلية:

1.4. الدورة الخلوية : Cell cycle

يشير مصطلح دورة الخلية إلى سلسلة من الأحداث التي تحدث في الخلية بشكل متعاقب و تؤدي إلى انقسام الخلية إلى خليتين متماثلتين، و تقسم دورة الخلية إلى أربعة أطوار رئيسية و هي: G1 ، S ، G2 ، M.

- الطور G1 (Gap1): وهو يفصل بين طور الانقسام (M) و طور تضاعف DNA (S).
- الطور S (Synthesis of DNA): وتتضاعف فيه مكونات DNA.
- الطور G2 (Gap2): يفصل هذا الطور بين نهاية الطور S و بداية طور الانقسام M.
- الطور M (Mitosis): ويحدث فيه انفصال الصبغيات و تحلل الغشاء النووي، و يقسم هذا الطور إلى عدة أطوار فرعية، وينتهي بانقسام الهيولى وانفصال الخليتين الجديدتين عن بعضهما.

وتدخل الخلية بعد طور الانقسام في مرحلة استقرار تسمى G0، وإذا تعرضت للتحفيز بعوامل النمو فإنها تدخل الدورة الخلوية من جديد، ويتم التحكم بدورة الخلية و انتقالها عبر الأطوار المختلفة عن طريق مجموعة من البروتينات المنظمة. ويفقد الجسم سيطرته وتنظيمه لهذه الدورة عند التسرطن، فتتكاثر الخلايا السرطانية دون ضبط [37]. الشكل(10).



الشكل(10) يوضح دورة الخلية، معدلة عن [37].

2.4. الفعالية التكاثرية في الأورام: Proliferative activity in tumors

إن من أهم صفات الورم أنه نسيج ينمو بسرعةٍ تفوق سرعة َ نمو النسج الطبيعية، وتتمتع خلاياه بقدرة الاستمرار على التكاثر دون الخضوع لسيطرة الجسم، وإن فهم العوامل المؤثرة في نمو الأورام يعد نقطة أساسية في دراستها [38]. ولذا فإن تحري الفعالية التكاثرية لأي ورم يعد أمراً ضرورياً لأهميته من حيث التنبؤ بسلوك الورم وإنذاره وسبل علاجه [40،39]. ولا تخرج أورام الغدد اللعابية عن هذه القاعدة إلا أن معظمها ينفرد بتعدد الخلايا الموجودة في الورم الواحد [36،34]، سيّما في الأورام التي تساهم فيها الخلية العضلية البشروية نظراً للخصائص الفريدة التي تتمتع بها هذه الخلايا والتي جعلتها تنال لقب كابحات الأورام، فالآمال المستقبلية معقودة عليها انطلاقاً من تلك الخصائص، وتجرى الآن العديد من الأبحاث على نظيرتها في الثدي لتفهم دورها أكثر في الأورام، والاستفادة منه في السبل العلاجية للسرطانات والسيطرة عليها [44،43،42،41]. إلا أن الأبحاث السابقة حول أورام الغدد اللعابية إما اقتصرت على إثبات مشاركة الخلية العضلية البشروية[45،18] أو تحدثت عن الفعالية التكاثرية للخلايا الورمية عموماً دون تمييزٍ بين أنواع الخلايا[48،47،46] وقد تم التغلب على هذه المشكلة عند البدء باستخدام تقنية التلوين المضاعف، فقد أصبح بالإمكان تلوين أكثر من مستضد في النسيج نفسه[49]. كما أن هناك من لم يجد أية فعالية تكاثرية لهذه الخلية في الغدد الطبيعية[50،46] وقد يتفق هذا مع النظرية التي تعتبر أن الخلايا عالية التخصص لا تتكاثر، وأن أورام الغدد اللعابية تنتج عن خلايا جذعية احتياطية في الجهاز القنيوي [16].

3.4. تحديد الخلية العضلية البشروية المتكاثرة/واسمات الدراسة:

لقد لونت الخلية العضلية البشروية تلويناً مضاعفاً في عدة أبحاث عن طريق تلوين هيولاها بالأكتين العضلي لتسهيل رؤيتها وبواسمٍ تكاثري مثل الـــ(Ki67) أومستضد التكاثر النووي (PCNA) اللذين يلونان النواة لإظهار الخلية المتكاثرة [51، 52، 53].

1.3.4. مستضد التكاثر النووي ودورة الخلية: Proliferative cell nuclear antigen

بروتين نووي يُشفر بمورثة تتوضع على الصبغي 20p12-13 ويبلغ وزنه الجزيئي 36 كيلو دالتون. يلعب دوراً مفتاحياً أساسياً في بدء اصطناع الــ DNA وفي تنظيم تتابع الدورة الخلوية، حيث يعمل كعامل مساعد(co-factor) في بوليميراز الدنا دلتا(DNA polymerase delta)، لذا فهو يظهر في الخلايا المتكاثرة في المرحلة S من الدورة الخلوية

. ويتحفز اصطناعه بمجموعة من عوامل النمو، كعامل النمو المشتق من الصفيحات (Platelet-derived GF)، وعامل النمو البشروي (Epidermal GF) [56]. ولذا فإن الـPCNA واسم مفيد لتحديد الخلايا المتضاعفة بالوسائل الكيميائية المناعية النسيجية، وهو من الواسمات التنبؤية المفيدة في أورام الغدد اللعابية، وتزداد نسبته بازدياد خباثة الأورام [57،48،47،46].

[55،54]

2.3.4. الأكتين: Actin

بروتين خلوي يقدر وزنه الجزيئي بـ43 كيلو دالتون، يوجد بغزارة في الخلايا المنواة (Eukaryotic cells) كالخلايا العضلية الهيكلية والملساء، وفي الخلايا غير العضلية أيضاً لدوره الأساسي في حركة الخلايا وتقلصها وفي دعم أغشيتها الخلوية، تشفره عائلة من المورثات، وتعطي أنماطاً متعددة (ألفا، بيتا، غما) تختلف بحسب نوع الخلية ووظيفتها، وقد يكون على شكلٍ شبكي أو كروي أو لييفاتٍ دقيقةٍ (Microfilament) تشكل جزءاً كبيراً من أجزاء الهيكل الخلوي (Cytoskeleton) للخلايا [58].

الهدف من البحث

تعد الخلايا العضلية البشروية من الخلايا المتخصصة، فهل هي ثابتة أم لها فعالية تكاثرية في النسيج الغدي الطبيعي؟ فقليلةٌ هي الدراسات التي تناولت هذا الجانب.

وماذا عن فعاليتها التكاثرية في الأورام التي تساهم فيها هذه الخلية؟

وما مدى الفرق بين فعاليتها في الأورام، وفعاليتها في الغدد اللعابية الطبيعية؟

وهل توجد فروق جوهرية بين فعاليتها التكاثرية، وبين فعالية الخلايا البشروية المجاورة لها في الورم نفسه؟

وهل تختلف هذه الفعالية باختلاف أنماط الورم أو درجاته؟

وبناءً على ذلك حددت أهداف البحث كالتالي:

1. تحري الفعالية التكاثرية للخلية العضلية البشروية في النسيج الغدي الطبيعي المتمثل بالغدة النكفية، والغدة تحت الفك.

2. تحري الفعالية التكاثرية للخلية العضلية البشروية، وتوزعها في السرطان المخاطي المشبه بالبشروي.

3. تحري الفعالية التكاثرية للخلية العضلية البشروية، وتوزعها في السرطان الكيسي المشبه بالغدي.

الباب الثاني

المواد والطرق

Materials and Methods

1. المواد.

1.1. العينة.

2.1. الأجهزة والأدوات المستخدمة.

3.1. المواد المستهلكة.

2. الطرق.

1.2. التلوين التقليدي.

2.2. التلوين المناعي المضاعف.

3.2. طريقة عد الخلايا.

4.2. التحليل الإحصائي.

1.1. العينة.

بلغت عينة البحث (33) حالة، أُخذت من أرشيف مشفى المواساة الجامعي، بين عامي 2002–2008، وبلغت نسبة الذكور(54.54%) بينما الإناث(30.3%) و(15.15%) مجهولة الجنس، تراوحت أعمارهم بين (11– 68) بمتوسط عمري (44.2 سنة). وخضعت الحالات للتقطيع والتلوين التقليدي من جديد، للتأكد من صحة تشخيصها، وقد أعيد تشخيصها وتصنيفها وفق تصنيف منظمة الصحة العالمية لأورام الغدد اللعابية 2005. وتوزعت العينة (الجدول 4) كالتالي:

- عينة طبيعية (10 حالات): وهي نسيج غدي لعابي خالٍ من أيّ تغيراتٍ مرضية، من النكفة (4 حالات)، من نسيجٍ غدي ٍسليم مرافق للورم الغدي متعدد الأشكال، من خارج المحفظة[49،48]. ومن الغدة تحت الفك (6 حالات)، تم استئصالها في سياق التجريف المرافق للسرطان البشروي شائك الخلايا الناشئ في الحفرة الفموية أو الحنجرة.
- السرطان المخاطي المشبه بالبشروي (10) حالات: (7) عالي الدرجة، و(3) منخفض الدرجة.
- السرطان الكيسي المشبه بالغدي (13) حالة، توزعت كما في الجدول5.

الجدول (4) يبين توزع عينة البحث.

نوع الغدة	العينة الطبيعية	العينة الورمية	
		السرطان الكيسي المسبه بالغدي	السرطان المخاطي المشبه بالبشروي
غدة نكفية	4	6	6
غدة تحت فكية	6	7	4
المجموع	10	13	10

الجدول (5) يبين توزع الأنماط في السرطان الكيسي المشبه بالغدي.

نمط الورم	غدد نكفية	غدد تحت فكية	المجموع
غربالي	2	3	5
أنبوبي	2	3	5
صلد	2	1	3
المجموع	6	7	13

2.1. الأجهزة والأدوات المستخدمة.

المبشرة النسيجيّة Microtome، محمّ مائي لفرش المقاطع النسيجيّة، فرن التجفيف، مايكروويف، المجهر الضوئي، قلم التحديد، الممص pipet. الأشكال(11،12،13،14،15).

3.1. المواد المستهلكة.

1.2.1. مجموعة التلوين المضاعف: EnVision™G|2 Doublestain system: Rabbit/Mouse(DAB+/Permanent Red), Code K5361, Dako

2.2.1. الضد الأول: Monoclonal Mouse Anti- (PCNA),Clone PC10 ،Code N1529, Dako ممدد (7مل)، وجاهز للاستخدام (Ready-to-use).

3.2.1. الضد الثاني: Monoclonal Mouse Anti- α Smooth Muscle Actin ،Clone 1A4,Code N1584 ممدد(7مل)، وجاهز للاستخدام (Ready-to-use).

4.2.1. مسحوق السائل الدارئ Phosphate Buffer Solution PBS, Code S3024, PH7, Dako (مسحوق في ظروف).

5.2.1. محلول استرجاع المستضد Target Retrieval Solution 10XConcentrate, code S1699, 500 mL citrate buffer, pH 6, Dako الأشكال(16،17،18،19،20).
6.2.1. كزيلول، كحول، ماء مقطر، شمع البارافين، شرائح زجاجيّة عادية ومناعية، الملونات النسيجية التقليدية: الهيماتوكسلين و الأيوزين.

2. الطرق.

1.2. التلوين التقليدي:

أعيد تقطيع وتلوين القوالب الشمعية الجاهزة للتأكد من تشخيصها، وكان هناك اتفاقٌ مع التشخيص السابق. وفيما يلي الطريقة :

1. يُثبت المكعب الشمعي على المبشرة النسيجية Microtome (LEICA RM 2155 المانيا)، الذي يوجه المكعب نحو شفرة التقطيع. ويحدد سمك المقاطع المأخوذة بـ5 ميكرون.

2. تُبسط هذه المقاطع البارافينية المبشورة في محم مائي (LEICA، ألمانيا) يحتوي ماءً مقطراً بدرجة حرارة أقل 10 درجات من درجة ذوبان الشمع بحدود40−45 درجة مئوية، وذلك من أجل إزالة تجاعيدها، وتحميلها على الشرائح الزجاجية.

3. توضع الشرائح الزجاجية في فرن (Necht drehen، ألمانيا) بدرجة حرارة 45−50 درجة مئوية لمدة(30−60 د) لتجفيفها من الماء.

4. وتوضع في حمامين من الكزيلول لدقيقتين، من أجل إزالة شمع البارافين.

5. وتوضع بعد ذلك في حمام كحول مطلق ثم كحول 95%،70%،50%ثم بالماء، ومدة كل خطوة دقيقتان، لإزالة الكزيلول، وإضافة الماء إلى النسيج.

6. تغسل الشرائح بالماء، وتوضع في الهيماتوكسلين لبضع دقائق، حسبَ قوة الهيماتوكسلين والمتعلقة بعمر تحضيره. وتغسل بالماء حتى يزول الهيماتوكسلين الزائد.

7. وتوضع في الأيوزين لمدة تعادل نصف مدة الهيماتوكسلين، وتغسل بالماء لإزالة الزائد من الأيوزين.

8. وتوضع في حمام كحول 70% لمدة دقيقة، ثم 95% لمدة دقيقة، ثم الكحول المطلق مرتين كل مرة دقيقة واحدة، وذلك لنزع الماء من النسيج.

9. وتوضع في الكزيلول لمرتين متتاليتين لمدة 3 دقائق في كل مرة، لطرد الكحول.

10. وتستر أخيراً بساترة زجاجية، بلاصق بلسم كندا. وتفحص بالمجهر الضوئي.

2.2. التلوين المناعي المضاعف: Double immunohistochemical labeling

يعمل هذا النظام على إظهار مستضدين مختلفين في نفس النسيج، ويعتمد إظهار المستضد الأول على أنزيم البيروكسداز(Horseradish Peroxidase, HRP) باستخدام صبغة الـــ DAB+، ويعتمد المستضد الثاني على أنزيم الفوسفاتاز القلوية (Alkaline Phosphatase, AP) باستخدام صبغة الـــ Permanent Red. والضد الأول في دراستنا، سيرتبط مع مستضد التكاثر النووي (PCNA)، في نواة الخلية إذا كانت في حالة التكاثر، وبالتالي سيُظهر جميع الخلايا المتكاثرة في النسيج مهما كانت أنواعها، وستظهر نواة الخلية بلون ٍ بنيٍّ. أما الضد الثاني، فسيرتبط مع الأكتين العضلي الموجود في هيولى الخلايا العضلية البشروية، وسيظهر بلون أحمر.

1.2.2. مجموعة التلوين المضاعف:

يتألف نظام التلوين المضاعف:**EnVision^{TM}G|2 Doublestain system** من تسع مواد:

1. Dual Endogenous Enzyme Block 11ملX3: ممدد وجاهز للاستخدام، يحتوي على ماء أوكسجيني0.05%(Hydrogen peroxidase) لكبح الفاعلية الداخلية الموجودة في النسيج لكل من أنزيم البيروكسيداز، والفوسفاتاز القلوية.
2. Polymer/HER 11ملX3: ممدد وجاهز للاستخدام، يحتوي على أنزيم البيروكسداز وبوليمير الدكستران، الذي يرتبط به كل من أنزيم البيروكسداز والأضداد الثانوية.
3. DAB+ substrate buffer 11ملX3: وهو المحلول الذي تُمدد به صبغة الـــDAB+ لتحضير الكاشف اللوني للتفاعل الأول بين أنزيم البيروكسداز والضد الأولي، ويظهر التفاعل بلونٍ بني.
4. DAB+ Chromogen 1.5ملX1.
5. Doublestain Block 11ملX3: ممدد وجاهز للاستخدام، ويعمل على إزالة آثار التفاعلات الناتجة عن الضد الأول لتهيئة النسيج للضد الثاني، منعاً لحدوث أي فعالية تصالبية بين الضدين.
6. Rabbit /mouse (link) 11ملX3: ممدد وجاهز للاستخدام، عبارة عن بوليمير دكستران تقترن به الأضداد الثانوية للضد الثاني.
7. Polymer/AP 11ملX3، ممدد، ويحتوي على أنزيم الفوسفاتاز القلوية.

8. Permanent Red Substrate Buffer 11مل3X: وهو المحلول الذي تُمدد به صبغة الـــ Permanent Red لتحضير الكاشف اللوني للتفاعل الثاني بين أنزيم الفوسفاتاز القلوية والضد الثاني، ويظهر التفاعل بلونٍ أحمر.

9. Permanent Red Chromogen 300 ميكرون1X.

2.2.2. تحضير العينة:

تُطبق الخطوات الخمسة الأولى نفسها المتبعة في التلوين التقليدي، باستثناء أن تحمل المقاطع النسيجية على شرائح مناعية، وليست عادية.

3.2.2. تحضير المحاليل :

1.3.2.2. يحضر المحلول الدارئ PBS بإذابة ظرف من المسحوق في لتر واحد من الماء المقطر ويحرك، درجة الحموضة=7.

2.3.2.2. يحضر محلول استرجاع المستضد بتخفيف السائل بالماء المقطر بنسبة 1- 10 (أي كل جزء من السائل يقابله 9 أجزاء من الماء المقطر) ونحصل بالنتيجة على درجة حموضة =6-6,2.

4.2.2. تحضير الكواشف اللونية:

1.4.2.2. تحضير محلول عمل الـــ+DAB: يحضر(1) ميكرون من ال (DAB substrate buffer) مع قطرة (25- 30 ميكرولتر) من الـــ (DAB Chromogen). إن كل 1 ميكرون كافية لعشرة مقاطع نسيجية.

2.4.2.2. تحضير محلول عمل الـــ Permanent Red: يمزج 100 جزء من (Permanent Red Substrate Buffer) مع جزء من الـــ (Permanent Red Chromogen)، كمزج (1مل) من الـــ (Permanent Red Substrate Buffer) مع(10) ميكرون من (Permanent Red Chromogen)، ويجب أن يستخدم المحلول المحضر خلال 30 دقيقة من تحضيره.

5.2.2. عملية استرجاع المستضد: Target Retrieval

1. يزال الشمع من الشرائح النسيجية ،كما ذكرنا سابقاً، وتعاد إماهتها.

2. تغمر في وعاءٍ مناسبٍ يحوي كميةً كافيةً من محلول استرجاع المستضد المحضر مسبقاً.

3. وتوضع الشرائح النسيجية في الماكروويف لمدة 15 دقيقة حتى درجة الغليان.

4. ومن ثم تغسل بمحلول السائل الدارئ PBS(التريس) من مرتين إلى ثلاث، في درجة حرارة الغرفة (20–25 درجة). كما يجب الانتباه حتى لا تجف المقاطع النسيجية أثناء خطوات التلوين المتتابعة.

6.2.2. خطوات التلوين المضاعف[60،59] EnVision^{TM}Gl2 Doublestain system.

الخطوة الأولى: Dual Endogenous Enzyme Block

يزال المحلول الدارئ (التريس) الزائد ويمسح حول العينة بلطف.

يحدد المقطع النسيجي بقلم التحديد (Dako Pen, Code S 2002).

يؤخذ 200 ميكرون من المادة بواسطة الممص (Eppendorf Research, Germany)، وتركز على النسيج ضمن الحدود المرسومة بقلم التحديد، لتغطي العينة تمامًا لمدة 5±1دقائق. وتغسل المقاطع النسيجية بلطفٍ بالمحلول الدارئ(التريس).

ثم توضع في حمامٍ جديدٍ من السائل الدارئ لمدة 5 دقائق. الأشكال(21،22،23).

الخطوة الثانية: Primary antibody no.1(PCNA)

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف.

يؤخذ 200 ميكرون من الضد ليغطي العينة تماماً لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

تغسل المقاطع النسيجية كما في الخطوة الأولى. الشكل(24).

الخطوة الثالثة: Polymer/ HER

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف.

يؤخذ 200 ميكرون من هذه المادة لتغطي العينة لمدة 10±1.

تغسل العينة كما في الخطوة الأولى، ويعاد الغسل مرتين.

الخطوة الرابعة: DAB+ working solution(الكاشف اللوني المحضر مسبقاً)

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة كما في السابق، الشكل(25).

ويؤخذ 200 ميكرون من المحلول لتغطي العينة لمدة 5−15دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

تغسل العينة بلطف بالماء المقطر. إن هذه المادة مسرطنة لذا يجب التخلص من بقاياها بحذر.

الخطوة الخامسة: Doublestain Block

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف.

يؤخذ200 ميكرون من المادة لتغطي العينة لمدة 3±1د.

وتغسل العينة كما في الخطوة الأولى.

الخطوة السادسة: Primary antibody no.2(ACTIN)

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف.

يؤخذ 200 ميكرون من الضد لتغطي العينة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

وتغسل العينة كما في الخطوة الأولى. الشكل (26).

الخطوة السابعة: Rabbit/mouse (link)

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف .

يؤخذ 200 ميكرون من المادة لتغطي العينة لمدة10±1د.

وتغسل العينة كما في الخطوة الأولى، ويعاد الغسل مرتين.

الخطوة الثامنة: Polymer/AP

يزال المحلول الدارئ الزائد ويمسح حول العينة بلطف .

يؤخذ 200 ميكرون من المادة لتغطي العينة لمدة10±1د.

وتغسل العينة كما في الخطوة الأولى، ويعاد الغسل مرتين.

الخطوة التاسعة: Permanent Red working solution (الكاشف المحضر مسبقاً)

يؤخذ200 ميكرون من المحلول لتغطي العينة لمدة 5−20 دقيقة في درجة حرارة الغرقة.

تغسل العينة بلطف بالماء المقطر.(إن هذه المادة مسرطنة لذا يجب التخلص من بقاياها بحذر)

توضع الشرائح المغسولة في ماء مقطر جديد لمدة 5 دقائق. الشكل (27).

الخطوة العاشرة: counterstain

تغمر العينات بهيماتوكسلين مايرز، لدقيقة واحدة، ومن ثم تغسل بالماء المقطر. الشكل(28).

الخطوة الحادية عشر: mounting

تستر العينات بالجيلاتين، بعد أن تجف تماماً.

3.2. طريقة عد الخلايا:

تمَّ عد400 خلية عضلية بشروية على الأقل في 5−10 ساحات عشوائية تحت التكبير القوي (kyowa Medilux-20, Japan, 40X) [49،53] والتي تعبر عن الأكتين في هيولاها بلون أحمرَ، وتحسب من خلالها الخلايا التي يكون فيها الـــ PCNA إيجابياً، أي تظهر نواتها بلون بنيّ، وهي التي تتلون تلويناً مضاعفاً. وبالنسبة للأورام، تمَّ عد الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية في نفس الساحات الورمية، وعلى الأقل 400 خلية من كل نوع[61،39]. وأخذت الصور النسيجية بكاميرا(Canon PC1210, Japan). كما استعين بمؤشر المجهر في تقسيم ساحةِ العد منعاً للالتباس. واستخدمت اللوزة الحنكية من أجل الضبط الإيجابي للـــ PCNA[50]، واستخدمت الأوعية الدموية ضمن لحمة النسج المدروسة (Internal positive control) كضبط إيجابي للأكتين[53].

4.2. التحليل الإحصائي: Statistical analysis

تمَّ استخدام اختبار كاي مربع للمقارنة بين المجموعات المختلفة عند مستوى ثقة95%، كما احتوى التحليل الإحصائي على جداول بالإحصاءات الوصفية، وعولجت البيانات باستخدام برنامج SPSS الإصدار 13.0 .



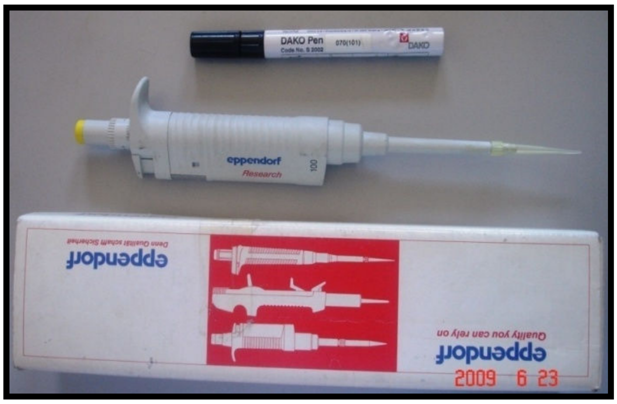
الشكل(11) يوضح المجهر المستخدم في البحث.



الشكل (12) المحم المستخدم لفرش المقاطع النسيجية.



الشكل (13) يوضح فرن التجفيف.



الشكل (14) يوضح الممص، وقلم تحديد المقاطع النسيجية.



الشكل(15) يوضح المبشرة النسيجية.



الشكل(16) يوضح كيت التلوين المناعي المضاعف.



الشكل (17) الضد الأول PCNA.



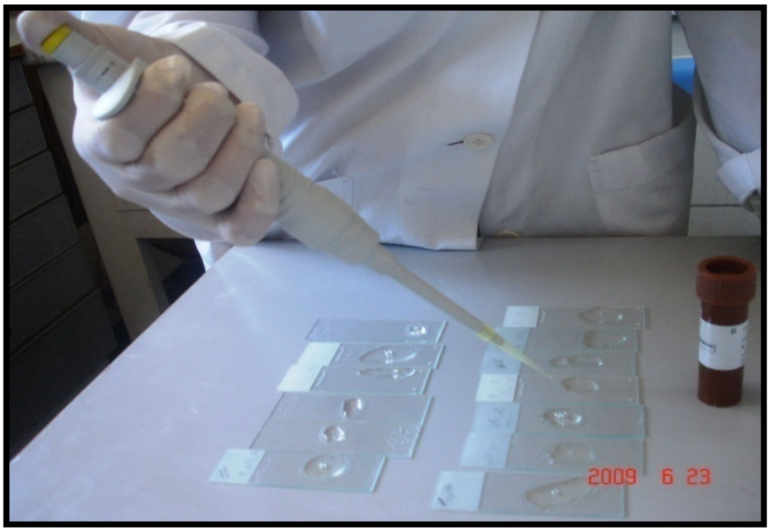
الشكل (18) الضد الثاني الأكتين.



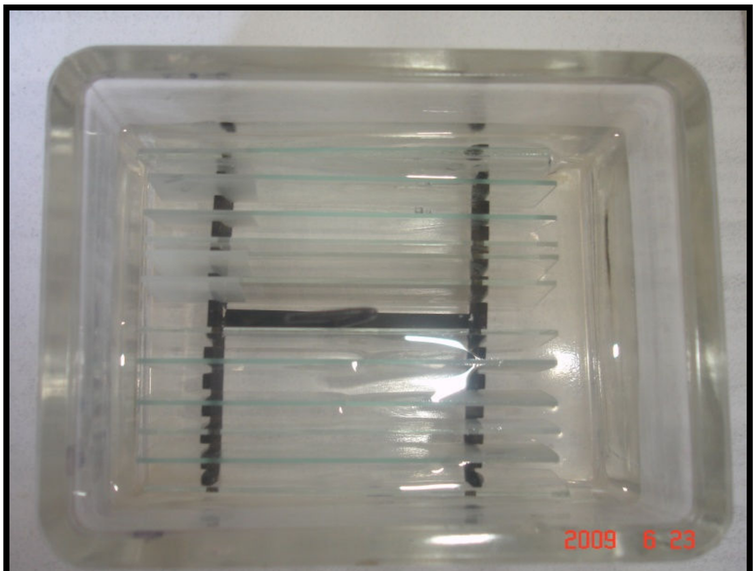
الشكل (19) محلول استعادة المستضد.



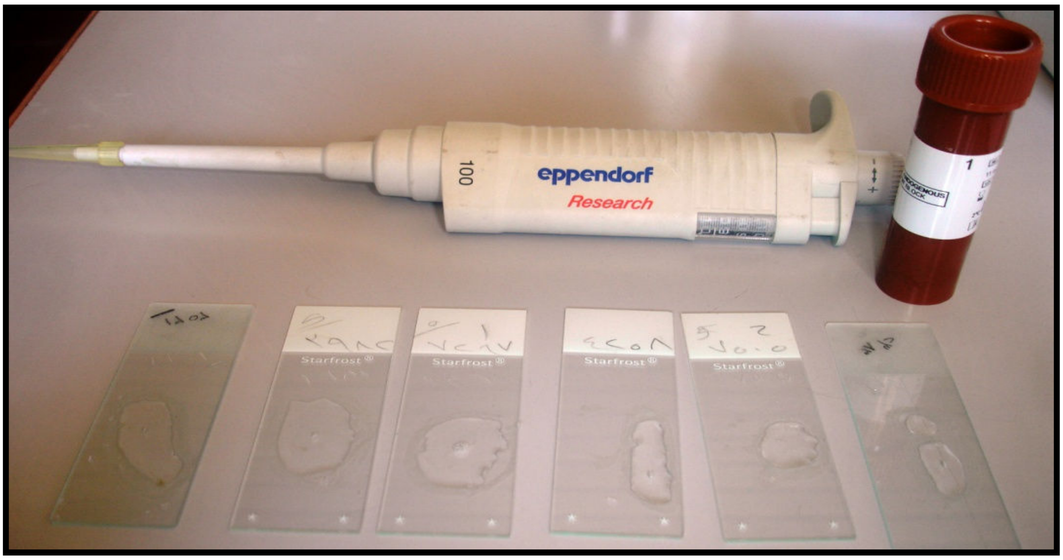
الشكل (20) مسحوق السائل الدارئPBS .



الشكل (21) يوضح كيفية تطبيق المواد على الشرائح النسيجية.



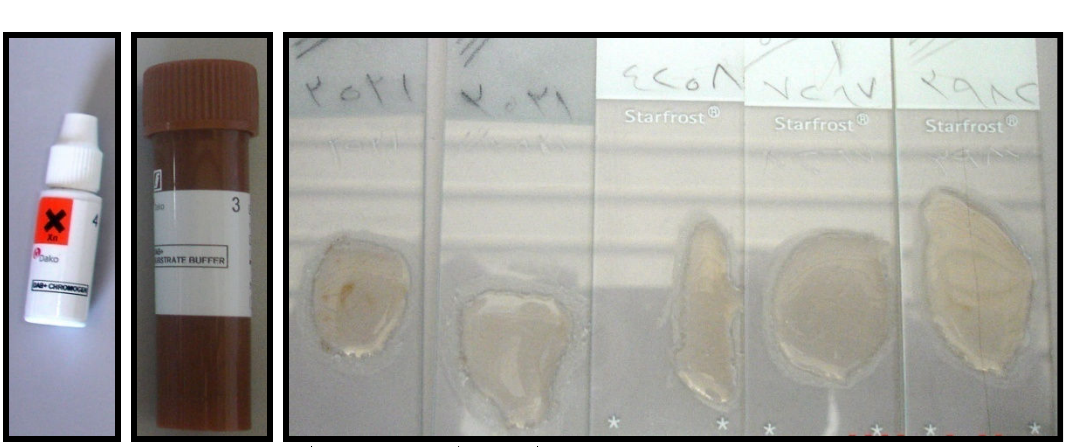
الشكل (22) يوضح الشرائح الزجاجية وهي مغمورة بمحلول السائل الدارئ.



الشكل (23) يوضح تطبيق المادة الأولى من الكيت.



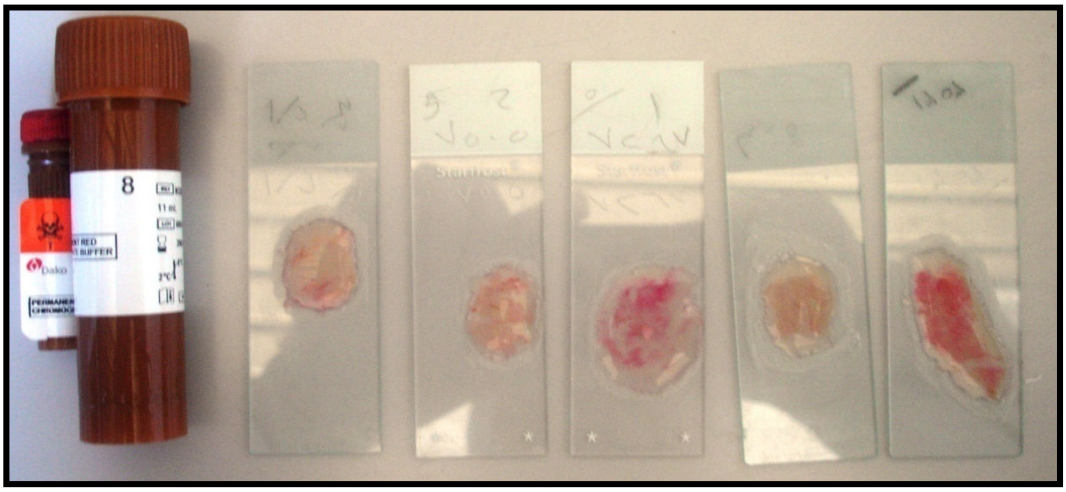
الشكل (24) يوضح تطبيق الضد الأول(PCNA).



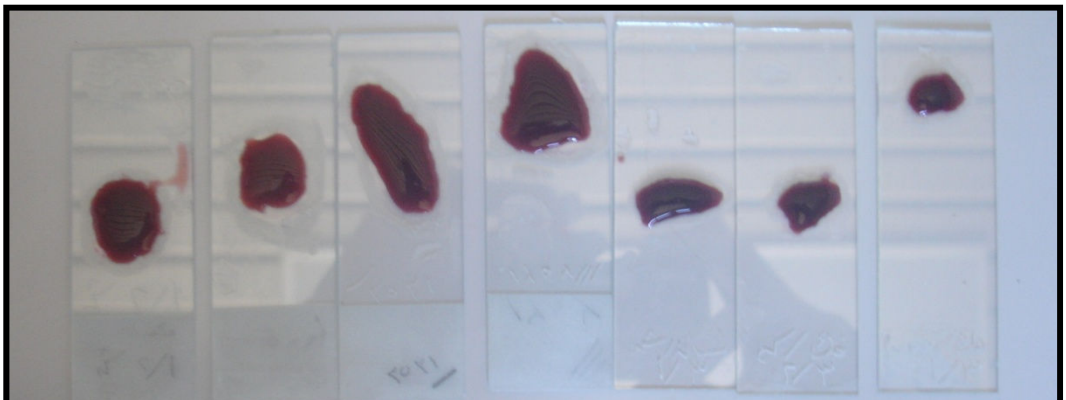
الشكل (25) يوضح المقاطع النسيجية وقد بدأت تتلون بصبغة ال+DAB.



الشكل (26) يوضح تطبيق الضد الثاني(الأكتين).



الشكل (76) يوضح المقاطع النسيجية وقد تلونت بصبغة الـــPermanent Red.



الشكل (28) يوضح المقاطع النسيجية مغمورة بالهيماتوكسلين مايرز.

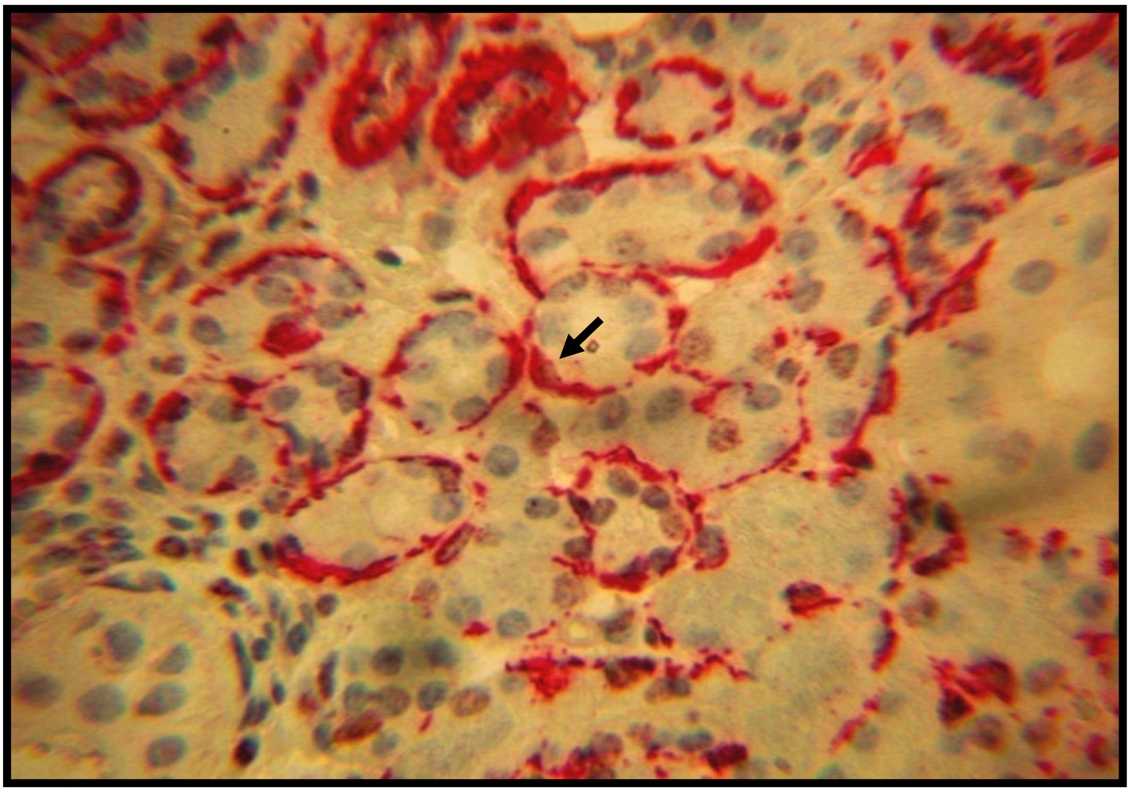
الباب الثالث

النتائج

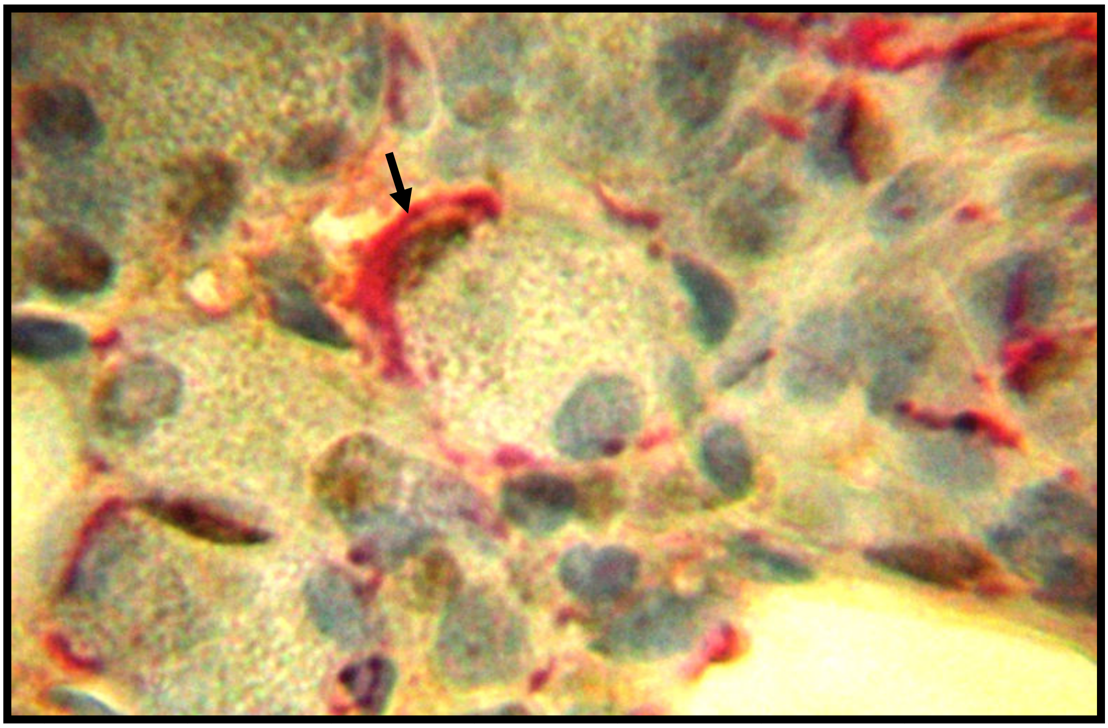
Results

1. **الفعالية التكاثرية للخلية العضلية البشروية في النسيج الغدي الطبيعي:**

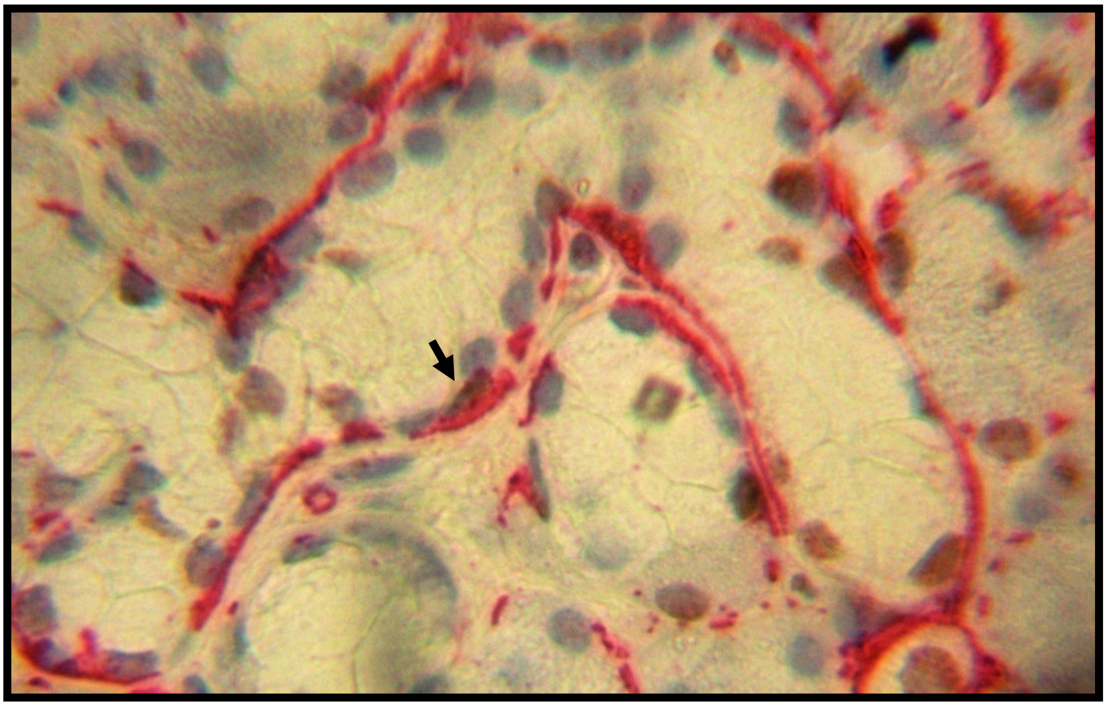
تركزت إيجابية الأكتين ضمن هيولى الخلايا العضلية البشروية حول العنبات والأقنية المقحمة، وحول الأوعية الدموية في اللحمة، وتركزت إيجابية الـ PCNA في نوى الخلايا، وتراوح عدد الخلايا العضلية البشروية المتكاثرة بين (0–15) خلية ضمن 400 خلية عضلية بشروية بنسبةٍ بلغت (1.6%)، وتوضح كل من الأشكال(29،30،31)، والجدول(6) والمخطط البياني (32) نتائجَ تكاثر الخلايا العضلية البشروية في كل من الغدة النكفية والغدة تحت الفك.



الشكل(29) يوضح توزع الخلايا العضلية البشروية في النسيج الغدي الطبيعي، وفيه خلية عضلية بشروية متكاثرة(السهم).



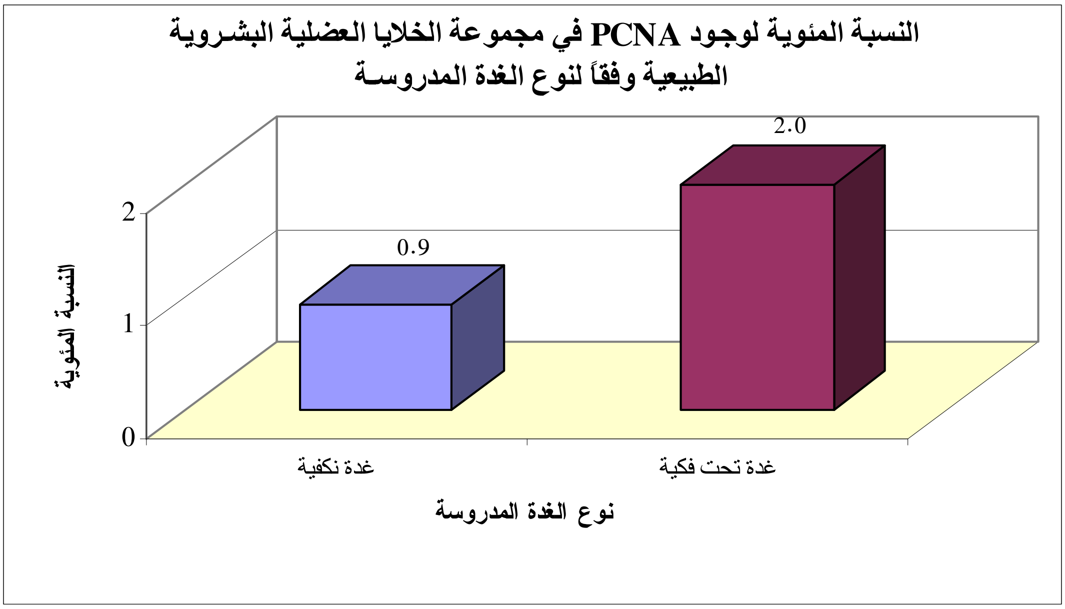
الشكل (30) خلية عضلية بشروية متكاثرة في النكفة، ويظهر الـPCNA في النواة بنياً، والأكتين في الهيولى أحمرَ.



الشكل (31) خلية عضلية بشروية متكاثرة في تحت الفك، ويظهر الـPCNA في النواة بنياً، والأكتين في الهيولى أحمرَ.

الجدول (6) يبين نتائج وجود الـ PCNA في الخلايا العضلية البشروية الطبيعية وفقاً لنوع الغدة المدروسة.

الحالة المرضية	نوع الخلايا	نوع الغدة المدروسة	عدد الحالاات	عدد الخلايا			النسبة المئوية		
				سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
غدة طبيعية	الخلايا العضلية البشروية	غدد نكفية	4	1585	15	1600	99.1	0.9	100
		غدد تحت فكية	6	2352	48	2400	98.0	2.0	100



المخطط (32) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود الـ PCNA في الخلايا العضلية البشروية الطبيعية وفقاً لنوع الغدة.

1.1. إحصاءات وصفية:

الجدول (7) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية وفقاً لنوع الغدد.

نوع الخلايا	نوع الغدد المدروسة	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
الخلايا العضلية البشروية	غدد نكفية	4	0.94	1.20	0.60	0	2.5
	غدد تحت فكية	6	2.00	1.74	0.71	0	3.75

2.1. الاختبار الإحصائي:

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود الــPCNA بين الغدة النكفية والغدة تحت الفك في مجموعة الخلايا العضلية البشروية الطبيعية كما في الجدول(8):

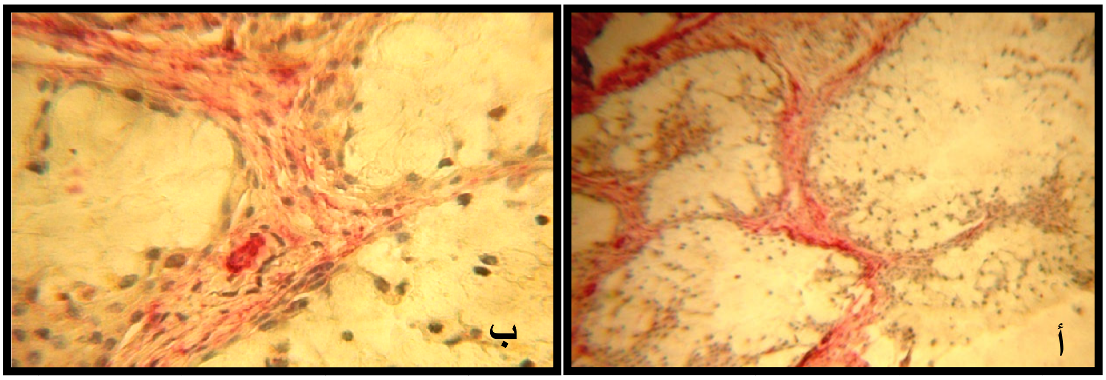
الجدول (8) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين الغدة النكفية و تحت الفك.

المتغيران المدروسان = نوع الغدد المدروسة × وجود PCNA						
الحالة المرضية	نوع الخلايا	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
غدة طبيعية	خلايا عضلية بشروية	4000	6.991	1	0.008	توجد فروق دالة

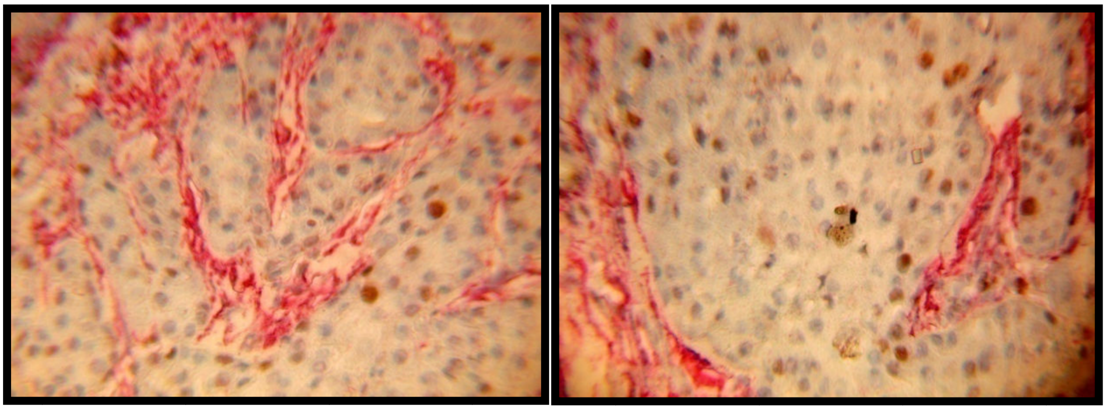
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود البروتين بين مجموعة الغدة النكفية ومجموعة الغدة تحت الفكية في مجموعة الخلايا العضلية البشروية الطبيعية، وبالرجوع إلى جدول التكرارات والنسب المئوية الموافق يُلاحظ أن نسبة وجود البروتين في مجموعة الغدة النكفية كانت أقل منها في مجموعة الغدة تحت الفكية في مجموعة الخلايا العضلية البشروية الطبيعية.

2. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي:

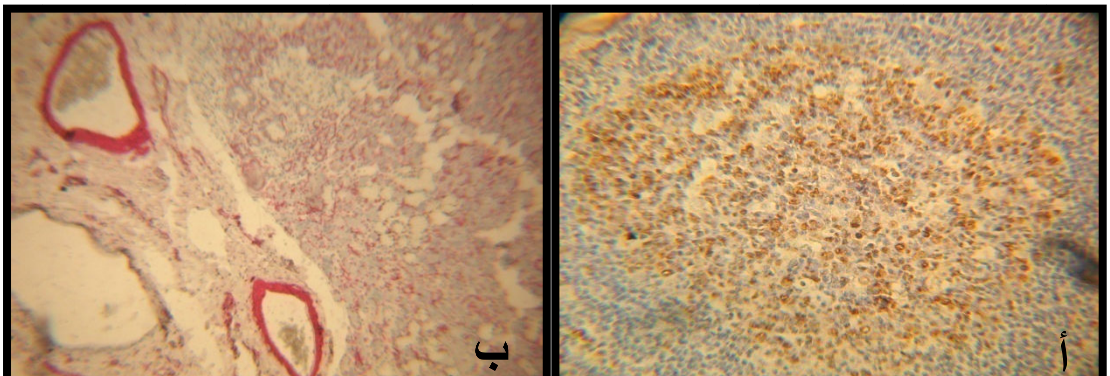
لم تشاهد أية إيجابية للأكتين في الخلايا، ولوحظت إيجابيته حول الأوعية الدموية فقط، و في لحمة الورم، أي أنه لا يوجد أي تمايز للخلية في هذا السرطان، أما الــPCNA فقد كانت إيجابيته واضحة خصوصاً في سرطانات الدرجة الثالثة، كما في الأشكال(34،33). ويوضح الشكل(35) الضبط الإيجابي لكل من الأكتين، ومستضد التكاثر النووي(PCNA).



الشكل(33) سرطان منخفض الدرجة، تظهر فيه إيجابية الأكتين في لحمة الورم فقط، بالتكبير الضعيف(أ)، والتكبير القوي(ب).



الشكل(34) سرطان عالي درجة الخباثة، يظهر فيه الأكتين أحمرَ في اللحمة فقط. وتظهر فيه خلايا حرشفية متكاثرة باللون البني.



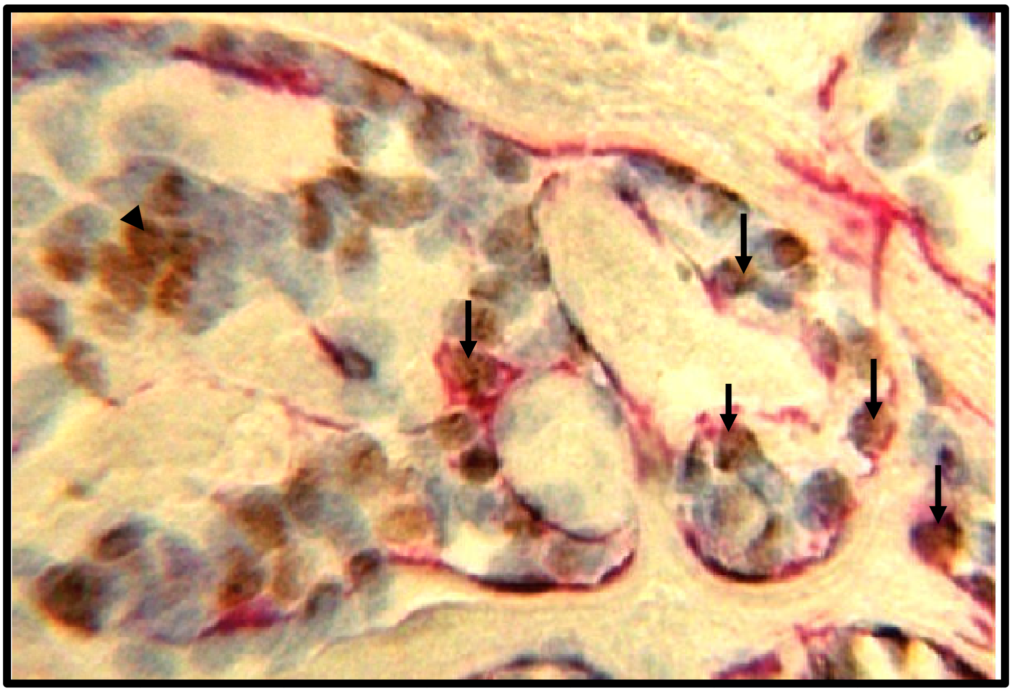
الشكل (35) الضبط الإيجابي للـــPCNA في المركز النتوج للجراب اللمفي في اللوزة(أ)، والضبط الإيجابي للأكتين حول الأوعية الدموية ضمن غدة طبيعية(ب).

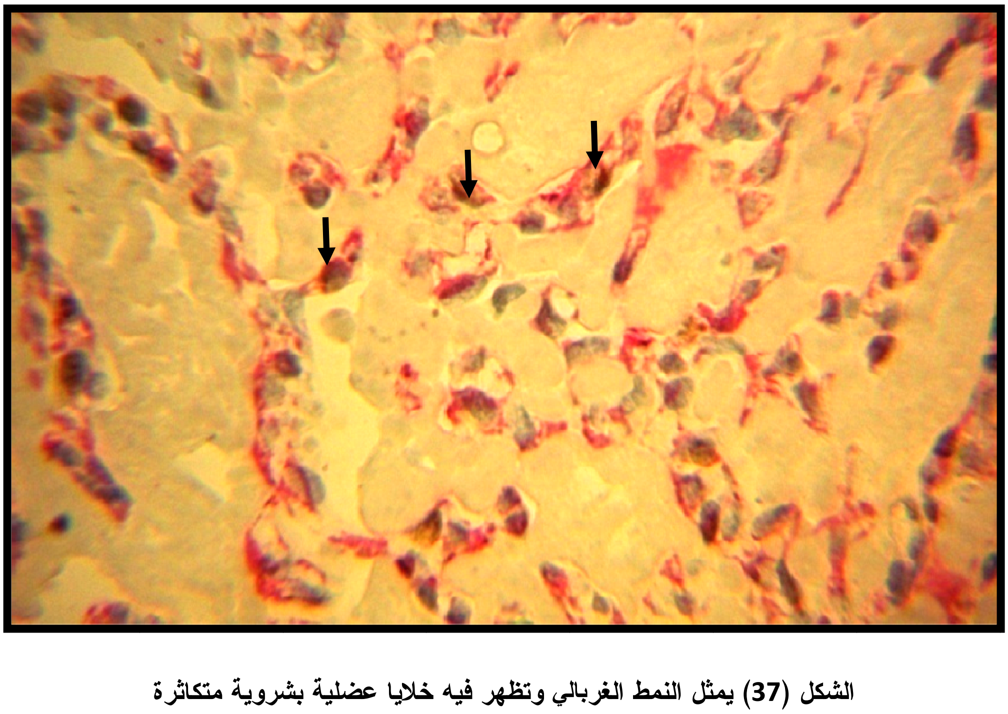
3. السرطان الكيسي المشبه بالغدي:

كانت إيجابية الأكتين متباينة الشدة بين ساحةٍ وأخرى في النمطين المثقب والأنبوبي، وتركزت بشكلٍ عام حول اللمع الكاذبة في النمط المثقب، بينما شكلت في النمط الأنبوبي طبقة خارجية حول الخلايا البشروية، وكان الأكتين سلبياً في النمط الصلد، الأشكال(36،37،38،39،40). وتراوح عدد الخلايا العضلية البشروية المتكاثرة بين (22–144) خلية في كل من النمط المثقب والأنبوبي ضمن 400 خلية عضلية بشروية، بينما تراوح عدد الخلايا البشروية المتكاثرة بين (25–140) في نفس النمطين ضمن إجمالي 400 خلية بشروية، بينما تراوح عدد الخلايا الورمية المتكاثرة في الصلد بين (108–288) خلية ورمية من 800 خلية ورمية.

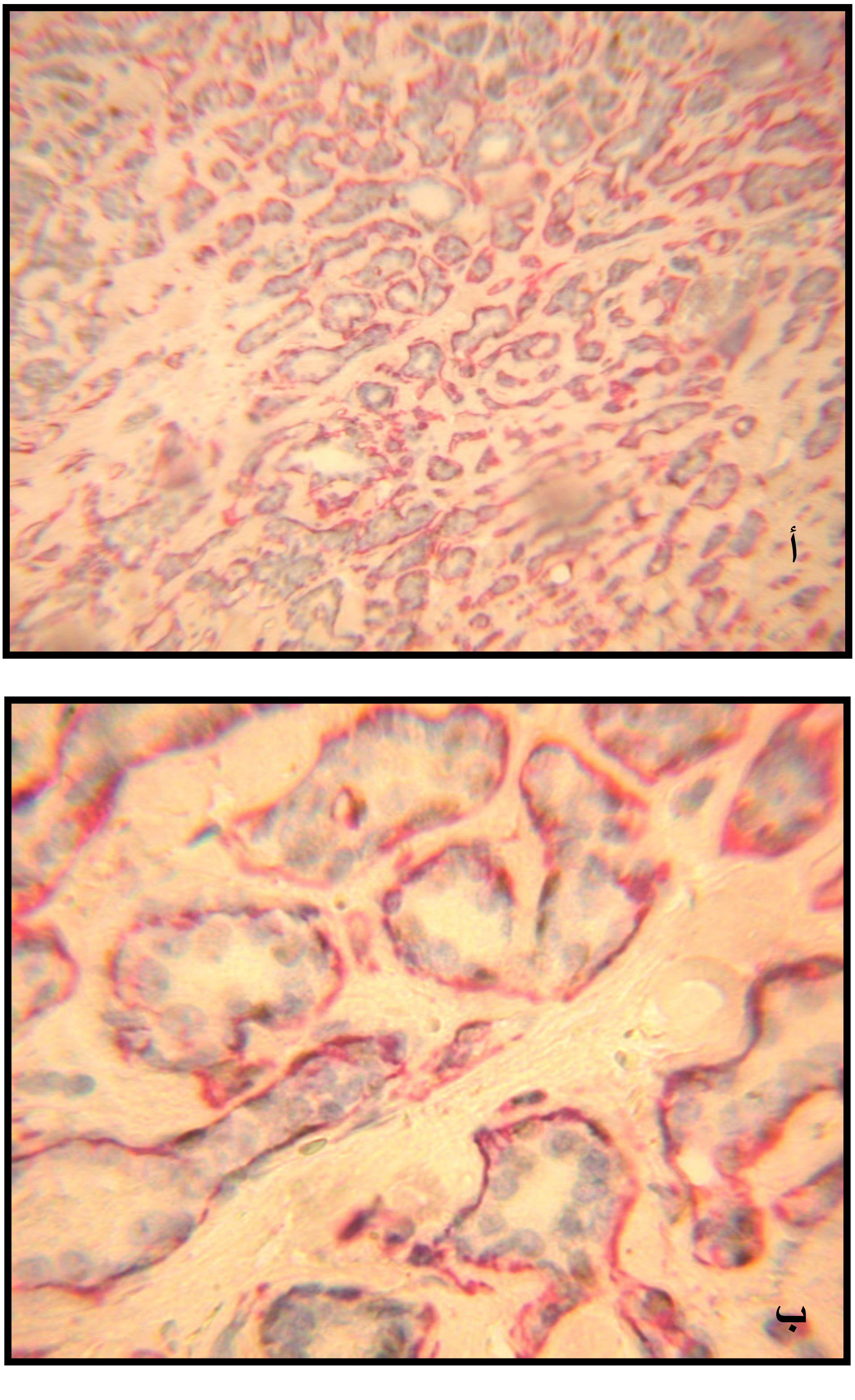


الشكل (36) يوضح توزع الخلايا العضلية البشروية في النمط المثقب وتظهر فيه إيجابية الأكتين باللون الأحمر.

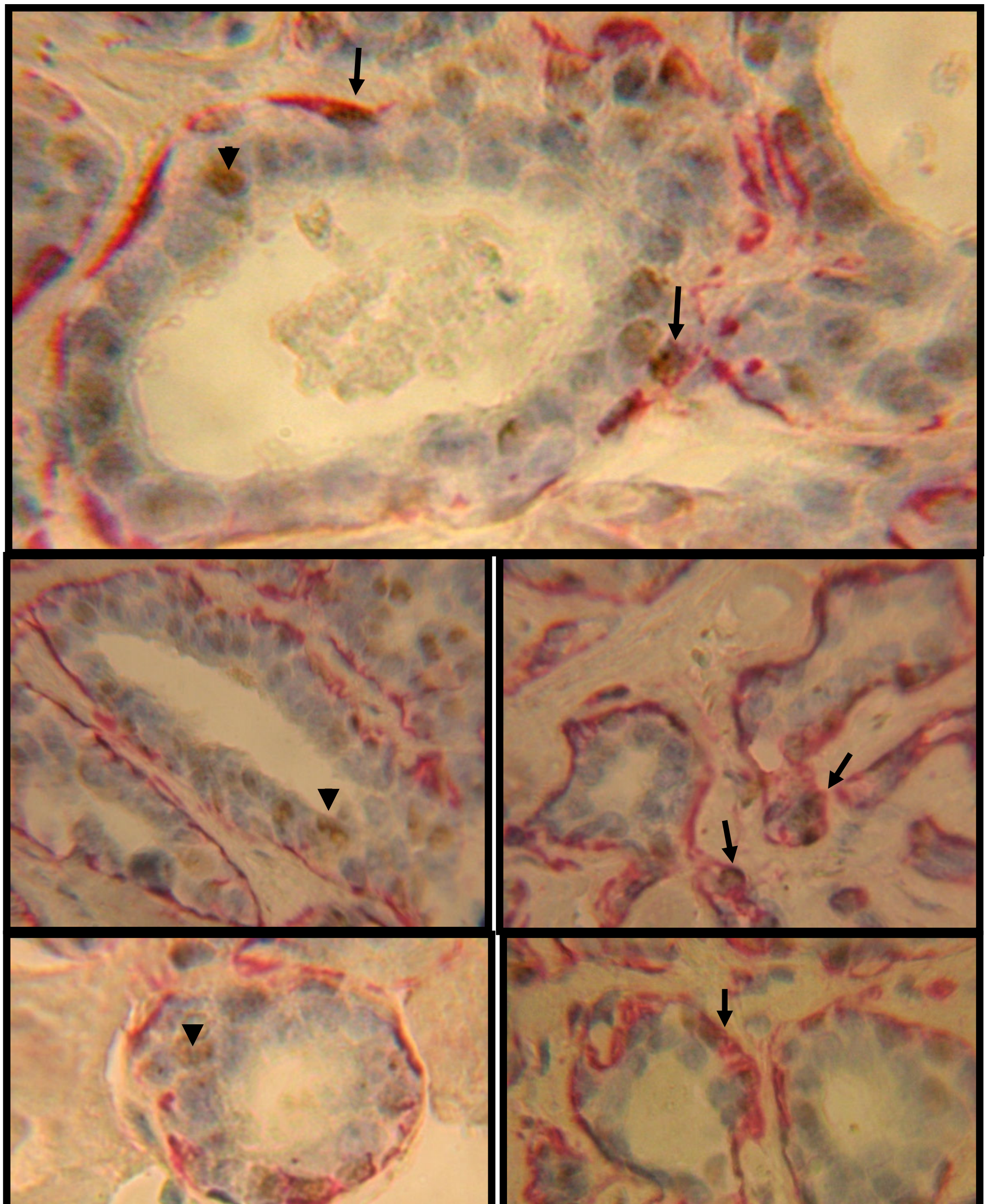




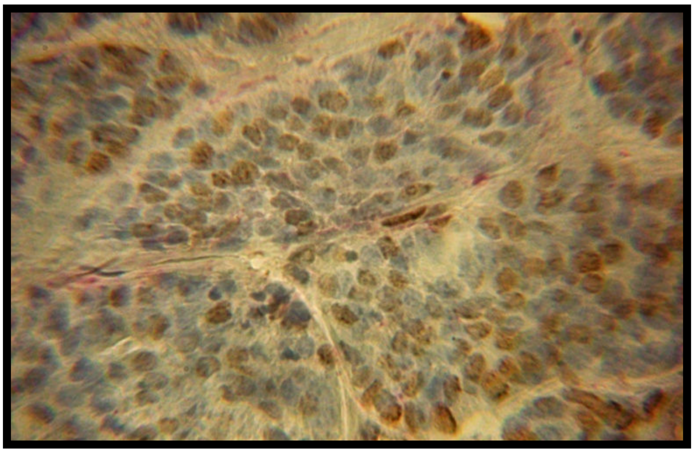
الشكل (37) يمثل النمط الغربالي وتظهر فيه خلايا عضلية بشروية متكاثرة ومصطبغة باللونين الأحمر والبني(السهم). وخلايا بشروية متكاثرة تأخذ اللون البني فقط (رأس السهم).



الشكل (38) يوضح توزع الخلايا العضلية البشروية في النمط الأنبوبي بالتكبير الضعيف(أ) والتكبير القوي(ب) وتظهر فيه إيجابية الأكتين باللون الأحمر محيطة بالخلايا البشروية التي تطل على اللمعة.



الشكل (39) يمثل النمط الأنبوبي وتظهر فيه الخلايا العضلية البشروية المتكاثرة ً باللونين الأحمر والبني(السهم) حول الخلايا البشروية. أما الخلايا اليشروية المتكاثرة تأخذ اللون البني فقط (رأس السهم) وتطل على اللمعة.



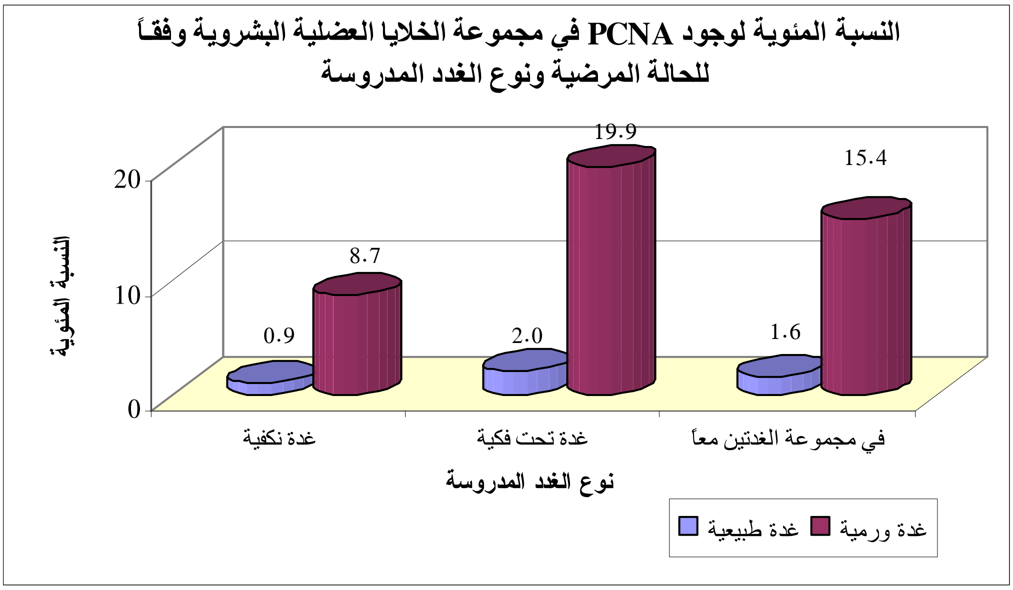
الشكل (40) يمثل النمط الصلد وتظهر فيه إيجابية الـ PCNA فقط.

1.3. الخلية العضلية البشروية في العينة الطبيعية والورمية:

1.1.3. نتائج وجود الــ PCNA في الخلايا العضلية البشروية وفقــاً للحالــة المرضــية ونوع الغدة المدروسة:

الجدول (9) يبين نتائج وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية وفقاً للحالة المرضية ونوع الغدة المدروسة.

نوع الغدد المدروسة	الحالة المرضية	عدد الخلايا العضلية البشروية			النسبة المئوية		
		سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
غدد نكفية	غدة طبيعية	1585	15	1600	99.1	0.9	100
	غدة ورمية	1461	139	1600	91.3	8.7	100
غدد تحت فكية	غدة طبيعية	2352	48	2400	98.0	2.0	100
	غدة ورمية	1923	477	2400	80.1	19.9	100
مجموعة الغدتين معاً	غدة طبيعية	3937	63	4000	98.4	1.6	100
	غدة ورمية	3384	616	4000	84.6	15.4	100



المخطط (41) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا العضلية البشروية وفقاً للحالة المرضية ونوع الغدة المدروسة.

2.1.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (1) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية وفقاً للحالة المرضية ونوع الغدد المدروسة.

نوع الغدد المدروسة	الحالة المرضية	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
غدد نكفية	غدة طبيعية	4	0.94	1.20	0.60	0	2.5
	غدة ورمية	4	8.69	3.56	1.78	5.5	12.25
غدد تحت فكية	غدة طبيعية	6	2.00	1.74	0.71	0	3.75
	غدة ورمية	6	19.88	13.47	5.50	5.75	36
مجموعة الغدتين معاً	غدة طبيعية	10	1.58	1.57	0.50	0	3.75
	غدة ورمية	10	15.40	11.77	3.72	5.5	36

3.1.3. دراسة تأثير الحالة المرضية على تكرارات وجود PCNA في مجموعة الخلايا العضلية البشروية وفقاً لنوع الغدد المدروسة:

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA في مجموعة الخلايا العضلية البشروية بين العينة الطبيعية والعينة الورمية كما يلي :

نتائج اختبار كاي مربع:

الجدول (11) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية بين العينة الطبيعية والعينة الورمية.

المتغيران المدروسان = الحالة المرضية × وجود PCNA						
نوع الخلايا	نوع الغدد المدروسة	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
خلايا عضلية بشروية	غدد نكفية	3200	104.892	1	0.000	توجد فروق دالة
	غدد تحت فكية	4800	393.605	1	0.000	توجد فروق دالة
	مجموع الغدتين معاً	8000	492.153	1	0.000	توجد فروق دالة

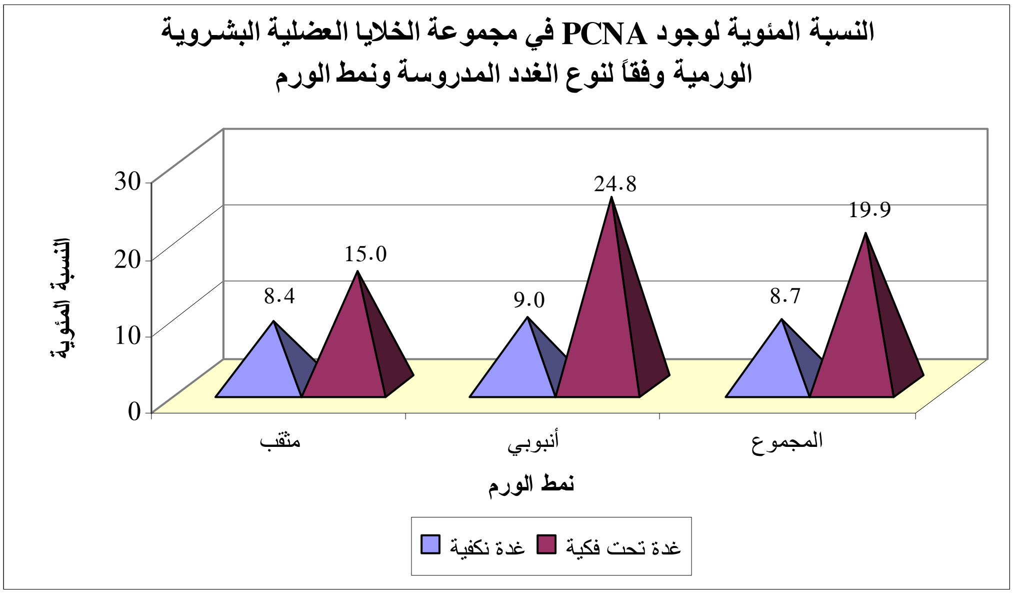
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـPCNA في الخلايا العضلية البشروية بين العينة الطبيعية والعينة الورمية، وذلك مهما كان نوع الغدة المدروسة، وبدراسة جدول التكرارات والنسب المئوية الموافق يُلاحظ أن نسبة وجود PCNA في العينة الطبيعية كانت أصغر منها بكثيرٍ في العينة الورمية وذلك مهما كان نوع الغدة.

2.3. الخلية العضلية البشروية في العينة الورمية:

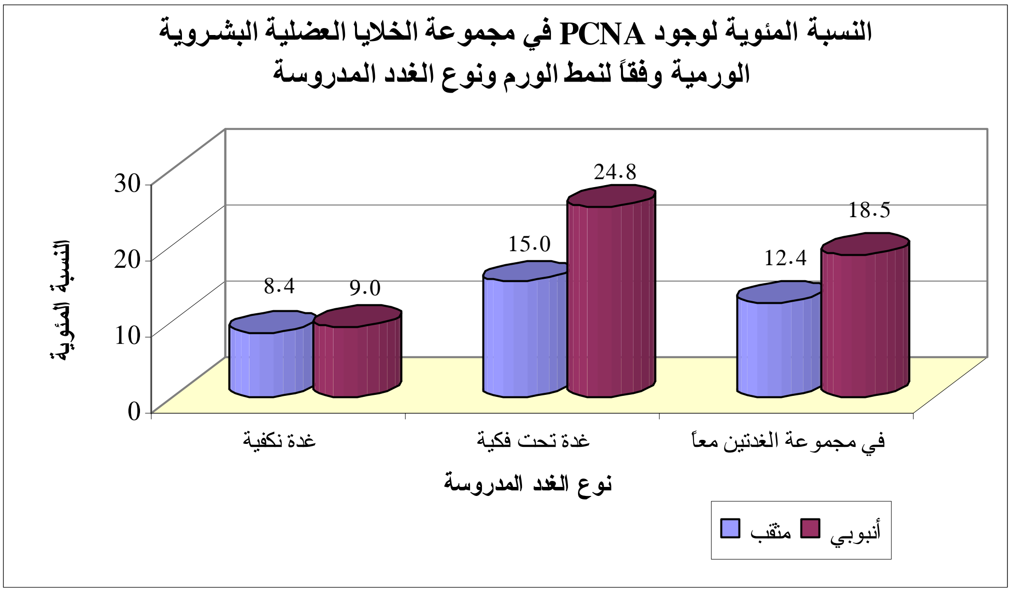
1.2.3. نتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا العضلية البشروية الورمية وفقاً لنــوع الغدة المدروسة ونمط الورم:

الجدول (2) يبين نتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا العضلية البشروية الورمية وفقاً لنوع الغدة المدروسة ونمط الورم.

نوع الغدد المدروسة	نمط الورم	عدد الخلايا العضلية البشروية			النسبة المئوية		
		سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
غدد نكفية	غربالي	733	67	800	91.6	8.4	100
	أنبوبي	728	72	800	91.0	9.0	100
	المجموع	1461	139	1600	91.3	8.7	100
غدد تحت فكية	غربالي	1020	180	1200	85.0	15.0	100
	أنبوبي	903	297	1200	75.3	24.8	100
	المجموع	1923	477	2400	80.1	19.9	100
مجموعة الغدتين معاً	غربالي	1753	247	2000	87.7	12.4	100
	أنبوبي	1631	369	2000	81.6	18.5	100
	المجموع	3384	616	4000	84.6	15.4	100



المخطط (42) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية وفقاً لنوع الغدة المدروسة ونمط الورم.



المخطط (43) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية وفقاً لنمط الورم ونوع الغدة المدروسة.

2.2.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (3) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية وفقاً لنمط الورم ونوع الغدد المدروسة.

نوع الغدد المدروسة	نمط الورم	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
غدد نكفية	غربالي	2	8.38	4.07	2.88	5.5	11.25
	أنبوبي	2	9.00	4.60	3.25	5.75	12.25
	المجموع	4	8.69	3.56	1.78	5.5	12.25
غدد تحت فكية	غربالي	3	15.00	10.42	6.02	8.25	27
	أنبوبي	3	24.75	16.55	9.55	5.75	36
	المجموع	6	19.88	13.47	5.50	5.75	36
مجموعة الغدتين معاً	غربالي	5	12.35	8.46	3.78	5.5	27
	أنبوبي	5	18.45	14.72	6.58	5.75	36
	المجموع	10	15.40	11.77	3.72	5.5	36

3.2.3. دراسة تأثير نوع الغدة على تكرارات وجـــود PCNA فـــي الخلايـــا العضـــلية البشروية الورمية:

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA فـــي الخلايـــا العضلية البشروية الورمية بين الغدة النكفية والغدد تحت الفك كما يلي:

نتائج اختبار كاي مربع :

الجدول (4) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية بين الغدة النكفية والغدة تحت الفك.

المتغيران المدروسان = نوع الغدة المدروسة × وجود PCNA						
نوع الخلايا	**نمط الورم**	**عدد الخلايا**	**قيمة كاي مربع**	**درجات الحرية**	**قيمة مستوى الدلالة المقدرة**	**دلالة الفروق**
خلايا عضلية بشروية ورمية	**غربالي (نكفة × تحت فك)**	2000	19.462	1	0.000	**توجد فروق دالة**
	أنبوبي (نكفة × تحت فك)	2000	79.137	1	0.000	**توجد فروق دالة**
	مجموع النمطين(نكفة × تحت فك)	4000	92.224	1	0.000	**توجد فروق دالة**

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـــPCNA فـــي الخلايـــا العضلية البشروية الورمية بين الغدة النكفية والغدة تحت الفك، **وذلك مهما كان نمـــط الـــورم.** وبالرجوع إلى جدول التكرارات والنسب المئوية الموافق نجد أن النسبة المئوية للـــ PCNA في الغدة النكفية (8.7%) كانت أصغر منها في الغدة تحت الفك(19.9%).

4.2.3. دراسة تأثير نمط الورم على تكــرارات وجــود PCNA فــي الخلايــا العضــلية البشروية الورمية.

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود الـــ PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية بين النمط المثقب والأنبوبي كما يلي:

نتائج اختبار كاي مربع :

الجدول (5) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية بين النمط المثقب والنمط الأنبوبي.

المتغيران المدروسان = نمط الورم × وجود PCNA						
نوع الخلايا	نوع الغدد المدروسة	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
خلايا عضلية بشروية ورمية	غدة نكفية(غربالي × أنبوبي)	1600	0.197	1	0.657	لا توجد فروق دالة
	غدة تحت فك (غربالي × أنبوبي)	2400	35.817	1	0.000	توجد فروق دالة
	مجموع الغدتين (غربالي × أنبوبي)	4000	28.561	1	0.000	توجد فروق دالة

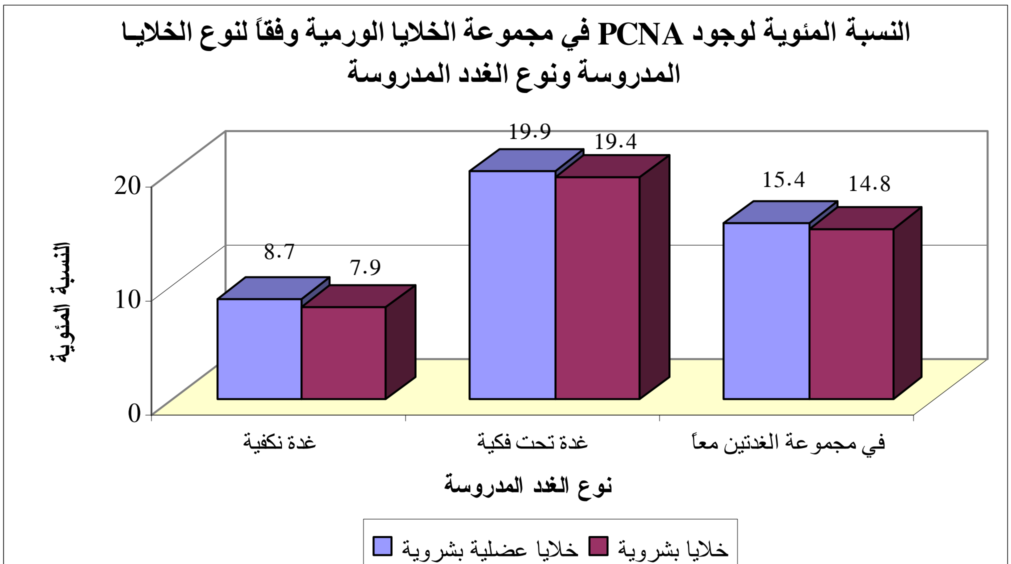
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 في مجموع الغدتين(أي عند إهمال منشأ السرطان) أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـــ PCNA في الخلايا العضلية البشروية الورمية بين النمط المثقب والنمط الأنبوبي، ونجد أن النسبة المئوية للـــ PCNA في النمط المثقب (12.4%) كانت أصغر منها في النمط الأنبوبي (18.5%)، وذلك عند الرجوع إلى جدول التكرارات والنسب المئوية الموافق. بينما لا توجد أية فروقٍ إحصائية بين النمطين في الغدة النكفية، وذلك عند أخذ منشأ السرطان بعين الاعتبار.

3.3. الخلية العضلية البشروية والخلية البشروية في العينة الورمية:

1.3.3. نتائج وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية والبشروية وفقاً لنوع الغدة:

الجدول (6) يبين نتائج وجود PCNA في الخليتين وفقاً لنوع الغدة.

نوع الغدد المدروسة	نوع الخلايا	عدد الخلايا			النسبة المئوية		
		سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
غدد نكفية	عضلية بشروية	1461	139	1600	91.3	8.7	100
	بشروية	1473	127	1600	92.1	7.9	100
غدد تحت فكية	عضلية بشروية	1923	477	2400	80.1	19.9	100
	بشروية	1934	466	2400	80.6	19.4	100
مجموع الغدتين	عضلية بشروية	3384	616	4000	84.6	15.4	100
	بشروية	3407	593	4000	85.2	14.8	100



المخطط (44) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في الخليتين وفقاً لنوع الغدة.

1.1.3.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (17) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية والبشروية.

نوع الغدد المدروسة	نوع الخلايا	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
غدد نكفية	عضلية بشروية	4	8.69	3.56	1.78	5.5	12.25
	بشروية	4	7.94	1.75	0.87	6.25	10
غدد تحت فكية	عضلية بشروية	6	19.88	13.47	5.50	5.75	36
	بشروية	6	19.42	10.97	4.48	7.5	35
مجموع الغدتين	عضلية بشروية	10	15.40	11.77	3.72	5.5	36
	بشروية	10	14.83	10.15	3.21	6.25	35

2.1.3.3. دراسة تأثير نوع الغدة على تكرارات وجود PCNA في الخلايا الورمية.

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين مجموعة الخلايا العضلية البشروية ومجموعة الخلايا البشروية، وفقاً لنوع الغدة المدروسة كما يلي:

الجدول (18) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية.

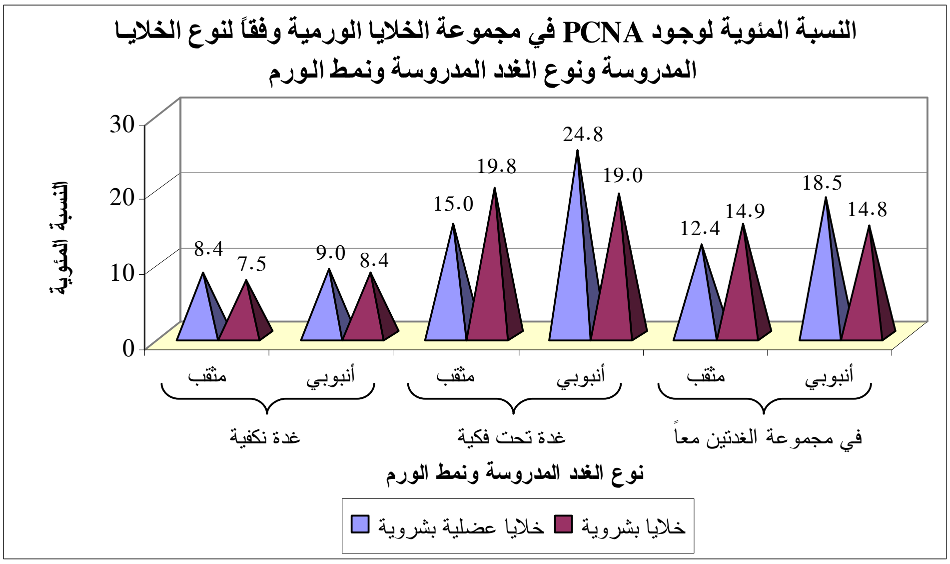
المتغيران المدروسان = نوع الخلايا × وجود PCNA						
نوع الغدد المدروسة	نوع الخلايا	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
غدد نكفية	خلايا عضلية بشروية × بشروية	3200	0.590	1	0.442	لا توجد فروق دالة
غدد تحت فكية	خلايا عضلية بشروية × بشروية	4800	0.160	1	0.689	لا توجد فروق دالة
مجموع الغدتين	خلايا عضلية بشروية × بشروية	8000	0.515	1	0.473	لا توجد فروق دالة

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـــ PCNA بين مجموعة الخلايا العضلية البشروية ومجموعة الخلايا البشروية، **وذلك مهما كان نوع الغدة.**

2.3.3. نتائج وجود الـ PCNA في الخلايا العضلية البشروية والبشروية وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم:

الجدول (19) يبين نتائج وجود PCNA في الخليتين وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم.

نوع الغدد المدروسة	نمط الورم	نوع الخلايا	عدد الخلايا			النسبة المئوية		
			سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
غدد نكفية	غربالي	عضلية بشروية	733	67	800	91.6	8.4	100
		بشروية	740	60	800	92.5	7.5	100
	أنبوبي	عضلية بشروية	728	72	800	91.0	9.0	100
		بشروية	733	67	800	91.6	8.4	100
غدد تحت فكية	غربالي	عضلية بشروية	1020	180	1200	85.0	15.0	100
		بشروية	962	238	1200	80.2	19.8	100
	أنبوبي	عضلية بشروية	903	297	1200	75.3	24.8	100
		بشروية	972	228	1200	81.0	19.0	100
مجموع الغدتين	غربالي	عضلية بشروية	1753	247	2000	87.7	12.4	100
		بشروية	1702	298	2000	85.1	14.9	100
	أنبوبي	عضلية بشروية	1631	369	2000	81.6	18.5	100
		بشروية	1705	295	2000	85.3	14.8	100



المخطط (45) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في الخليتين وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم.

1.2.3.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (20) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA في الخليتين وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم.

نوع الغدد المدروسة	نمط الورم	نوع الخلايا	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
غدد نكفية	غربالي	عضلية بشروية	2	8.38	4.07	2.88	5.5	11.25
		بشروية	2	7.50	1.77	1.25	6.25	8.75
	أنبوبي	عضلية بشروية	2	9.00	4.60	3.25	5.75	12.25
		بشروية	2	8.38	2.30	1.63	6.75	10
غدد تحت فكية	غربالي	عضلية بشروية	3	15.00	10.42	6.02	8.25	27
		بشروية	3	19.83	13.97	8.06	7.5	35
	أنبوبي	عضلية بشروية	3	24.75	16.55	9.55	5.75	36
		بشروية	3	19.00	10.27	5.93	7.5	27.25
مجموع الغدتين	غربالي	عضلية بشروية	5	12.35	8.46	3.78	5.5	27
		بشروية	5	14.90	12.00	5.37	6.25	35
	أنبوبي	عضلية بشروية	5	18.45	14.72	6.58	5.75	36
		بشروية	5	14.75	9.38	4.19	6.75	27.25

2.2.3.3. دراسة تأثير نوع الغدة ونمط الورم على تكرارات وجود PCNA في الخلايا البشروية والعضلية البشروية.

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين مجموعة الخلايا العضلية البشروية ومجموعة الخلايا البشروية، وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم كما يلي:

الجدول (7) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية وفقاً لنوع الغدة ونمط الورم.

المتغيران المدروسان = نوع الخلايا × وجود PCNA							
نوع الخلايا	نوع الغدد المدروسة	نمط الورم	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
عضلية بشروية × بشروية	غدد نكفية	غربالي	1600	0.419	1	0.517	لا توجد فروق دالة
		أنبوبي	1600	0.197	1	0.657	لا توجد فروق دالة
	غدد تحت فكية	غربالي	2400	9.745	1	0.002	توجد فروق دالة
		أنبوبي	2400	11.608	1	0.001	توجد فروق دالة
	مجموع الغدتين	غربالي	4000	5.525	1	0.019	توجد فروق دالة
		أنبوبي	4000	9.888	1	0.002	توجد فروق دالة

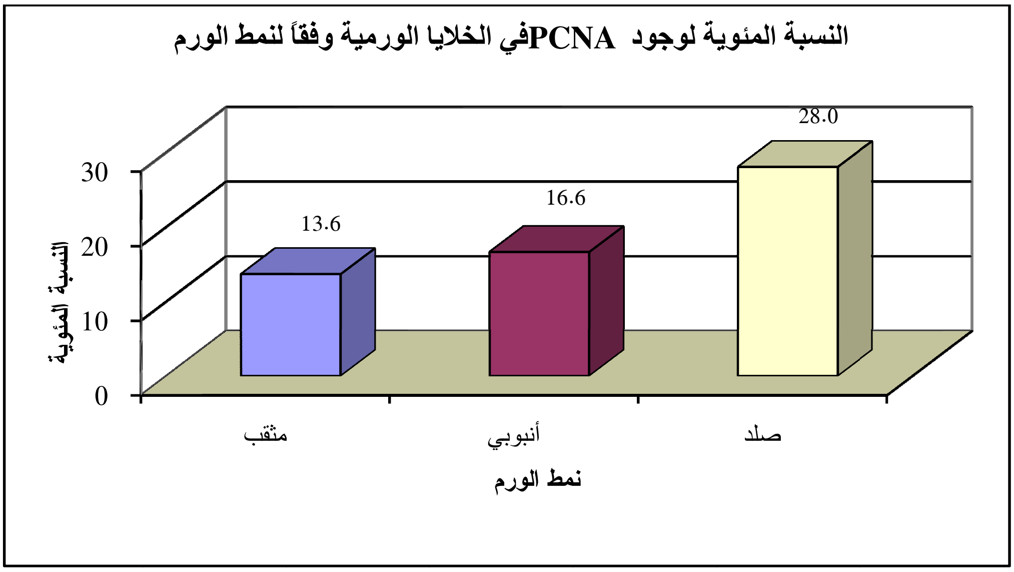
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05 في مجموع الغدتين(بغض النظر عن نوع الغدة) أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـــ PCNA بين الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية، وذلك في كل من النمط المثقب والأنبوبي، وعند الرجوع إلى جدول التكرارت والنسب، نجد أن نسبة الـــ PCNA في الخلايا العضلية البشروية (18.5%) كانت أكبر منها في الخلايا البشروية (14.8%) في النمط الأنبوبي، بينما نجد في النمط المثقب أن نسبة الـــ PCNA في الخلايا البشروية (14.9%) أعلى منها في الخلايا العضلية البشروية (12.4%). وتنطبق هذه النتيجة نفسها على الغدة تحت الفك، وذلك عند أخذ نوع الغدة بعين الاعتبار، بينما كانت قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 في الغدة النكفية، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الـ PCNA بين الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية في الغدة النكفية مهما كان نمط الورم.

3.3.3. مقارنة الفعالية التكاثرية للخلايا الورمية عموماً بين الأنماط الثلاثة.

1.3.3.3. نتائج وجود الـــPCNA في الخلايا الورمية وفقاً لنمط الورم:

الجدول (22) يبين نتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية وفقاً لنمط الورم.

نوع الخلايا	نمط الورم	عدد الخلايا			النسبة المئوية		
		سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
الخلايا الورمية	غربالي	3455	545	4000	86.4	13.6	100
	أنبوبي	3336	664	4000	83.4	16.6	100
	صلد	1728	672	2400	72.0	28.0	100



المخطط (46) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية وفقاً لنمط الورم.

2.3.3.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (8) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسب وجود PCNA وفقاً لنمط الورم.

نوع الخلايا	نمط الورم	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
الخلايا الورمية	غربالي	5	13.63	10.10	4.52	5.88	31
	أنبوبي	5	16.60	12.03	5.38	6.25	31.63
	صلد	3	28.00	12.58	7.26	13.50	36

3.3.3.3. دراسة تأثير نمط الورم على تكرارات وجود PCNA في الخلايا الورمية:

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق الثنائية في تكرارات وجـــود PCNA بـــين الأنماط الثلاثة، كما يلي :

الجدول (9) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين الأنماط.

المتغيران المدروسان = نمط الورم × وجود PCNA							
نوع الخلايا	مجموعة النمط الأولى	مجموعة النمط الثانية	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
الخلايا الورمية	غربالي	أنبوبي	8000	13.798	1	0.000	توجد فروق دالة
		صلد	6400	201.277	1	0.000	توجد فروق دالة
	أنبوبي	صلد	6400	118.021	1	0.000	توجد فروق دالة

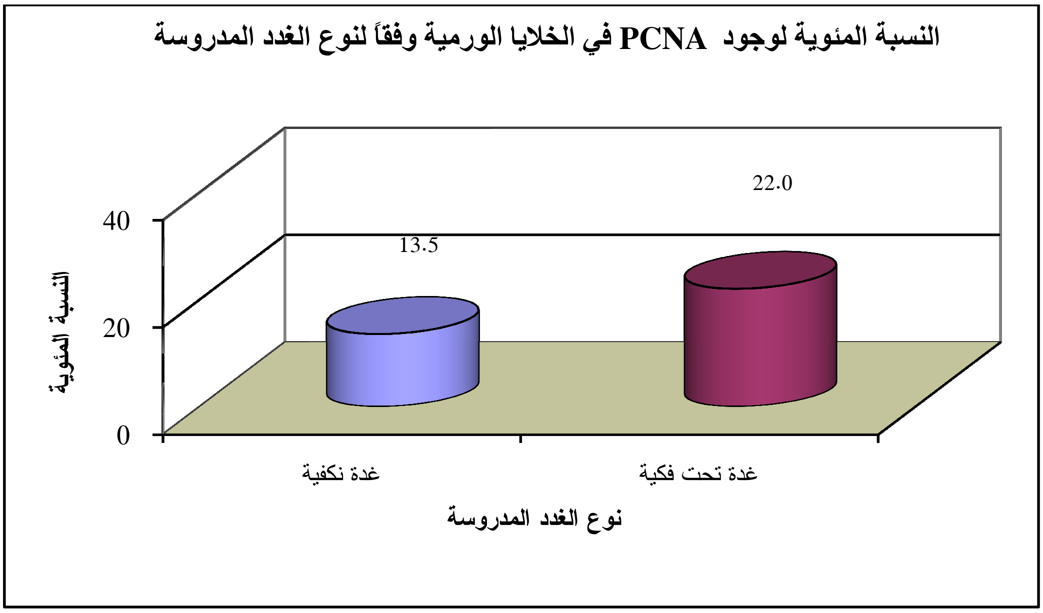
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمـــة 0.05 بالنســـبة لجميـــع المقارنات الثنائية المدروسة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ثنائيـــة ذات دلالـــة إحصائية في تكرارات وجود الـــ PCNA بين الأنماط، وبدراسة جدول التكرارات والنســـب المئوية الموافق نجد أن نسبة الـــPCNA في النمط الصلد (28%) كانت هي الأعلى يتلـــوه الأنبوبي (18.5%)، فالمثقب (12.4%).

4.3.3. مقارنة الفعالية التكاثرية للخلايا الورمية عموماً بين الغدتين:

1.4.3.3. نتائج وجود الـ PCNA في الخلايا الورمية وفقاً لنوع الغدة:

الجدول (25) يبين نتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية وفقاً لنوع الغدة.

نوع الخلايا	نوع الغدد المدروسة	عدد الخلايا			النسبة المئوية		
		سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع	سلبي PCNA	إيجابي PCNA	المجموع
الخلايا الورمية	غدد نكفية	4150	650	4800	86.5	13.5	100
	غدد تحت فكية	4369	1231	5600	78.0	22.0	100



المخطط (47) يمثل النسبة المئوية لنتائج وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية وفقاً لنوع الغدة .

2.4.3.3. إحصاءات وصفية:

الجدول (26) يبين المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لنسبة وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية من عينة البحث وفقاً لنوع الغدد المدروسة.

نوع الغدد المدروسة	عدد الحالات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
غدد نكفية	6	13.54	10.67	4.36	5.875	34.5
غدد تحت فكية	7	21.98	12.31	4.65	6.625	36

3.4.3.3. دراسة تأثير نوع الغدة على تكرارات وجود الـ PCNA في الخلايا الورمية:

تم إجراء اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA في مجموعة الخلايا الورمية بين ة الغدة النكفية والغدة تحت الفك كما يلي:

الجدول (27) يبين نتائج اختبار كاي مربع لدراسة دلالة الفروق في تكرارات وجود PCNA بين الغدتين.

المتغيران المدروسان = نوع الغدد المدروسة × وجود PCNA						
الحالة المرضية	نوع الخلايا	عدد الخلايا	قيمة كاي مربع	درجات الحرية	قيمة مستوى الدلالة المقدرة	دلالة الفروق
غدة ورمية	خلايا عضلية بشروية وبشروية معاً	10400	124.285	1	0.000	توجد فروق دالة

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في تكرارات وجود الــــ PCNA بــين الغــدة النكفية و الغدة تحت الفك، وبدراسة جدول التكرارات والنسب المئوية الموافق نجد أن نســبة الـــ PCNA في الغدة النكفية (13.5%) كانت أصغر منها في الغدة تحت الفكية (22%) .

الباب الرابع

المناقشة

Discussion

1. الخلية العضلية البشروية الطبيعية : Normal Myoepithelial cell

تكاثرت الخلية العضلية البشروية في دراستنا بنسبة (1.6%) وقد بلغت هذه النسبة في الغدة النكفية (0.9%) وفي الغدة تحت الفك (2%)، مع فروق إحصائية.

تعد الخلية العضلية البشروية من الخلايا ذات التخصص العالي(End-differentiated)، لذا كان يعتقد فيما مضى أنها لا تتكاثر أبداً أو أنها تتكاثر بقلةٍ شديدة[62]، كما ذكرت بعض الدراسات[50،46] التي استخدمت مستضد التكاثر النووي (PCNA) لتحري تكاثر الخلايا في الغدد الطبيعية والأورام اللعابية، ذكرت أنّ هذه الخلية كانت سلبية تجاهه، ومع ذلك فإن الأبحاث حول فعاليتها التكاثرية قليلة[63]، وقد أمكن التغلب على مشاكل دراستها بعد ظهور تقنية التلوين المضاعف، التي ساعدت على تحديد الخلية بدقة، وتحري تكاثرها في نفس الوقت[49]، فتتالت الأبحاث التي تدرس فعاليتها عند الجرذان عن طريق الربط التجريبي للغدد اللعابية وبواسطة التلوين المضاعف لها(Actin&PCNA)، وأثبتت تكاثرها في الحالة الطبيعية، كما أثبتت التزايدَ الملحوظ لهذا التكاثر في الحالات المرضية للغدد كالضمور[63،52،51]، والدراسة الأولى على الغدد البشرية باستخدام التلوين المضاعف كانت لــIhrler الذي أثبت تكاثر الخلية العضلية البشروية في النكفة الطبيعية[53]، وأنها تضاعفت عشرين ضعفاً أثناء التهاب الغدة[49]، وكل هذه الأبحاث تدحض النظرية(Bicellular theory)التي تقوم على أن تجدد الغدد اللعابية ونشوء أورامها، يقوم على خلايا جذعية في النظام القنيوي[16]، وقد ذكر Dardick[64] أن هذه النظرية غير مدعومة بالدليل المباشر، على عكس نظرية (Multicellular theory) التي تساندها أبحاث كثيرة، وتؤكد أن جميع خلايا الغدد اللعابية تتكاثر[65،64،53،48]، وقد يفسر ذلك: أن التمايز يحتاج إلى تنظيمٍ مستمر، وأن بقاء الخلية المتخصصة في وضعٍ ثابتٍ ليس نهاية حتمية، بل يخضع لجملة من البروتينات الكابحة والمنشطة، والتي تعمل سلباً وإيجاباً وبتوافقية مستمرة فيما بينها لتفعيل تنظيم التمايز، وإن أي تبدل بسيط في هذه المنظّمات سينعكس على تمايز الخلية، لذا فإن استمرار هذه المنظّمات ضروري للحفاظ على حالة التمايز[66]. وقد فسّر Burgess[63]أن الفعالية المنخفضة للخلية العضلية البشروية عند الفئران من أجل التجدد الخلوي للحفاظ على استقرار النسيج الغدي، كما فسر Ihrler[49] تكاثر الخلايا العضلية البشروية والعنبية والمقحمة، بأن التجدد الفسيولوجي للعنبات و الأقنية المقحمة يتحقق من خلال ذلك، ونحن نتفق معهما في ذلك لما

ذكرناه سابقاً من دور هذه الخلية الهام في الحفاظ على استقطاب الخلايا البشروية، وفي ترميم الصفيحة القاعدية، وفي تصنيعها لكثير من البروتينات الهامة والتي تعزز هذه الوظائف كاللامنين والكولاجين والفبرونكتين، وبالتالي المحافظة على البنية الهندسية للعنبات. فقد وجد Gudjonsson [21] أن الخلايا البشروية في الثدي فشلت في تكوين عنبات عند زراعتها في هلام من الكولاجين1، إذ شكلت بنى بدون لمعة وبقطبية معكوسة، وقام بإضافة خلايا عضلية بشروية سليمة مستخلصة من غدد بشرية، فوجد أن هذه الخلايا صححت القطبية المعكوسة للخلايا البشروية، واستطاعت فيما بعد أن تشكل عنبات نظامية. وقد تعود الفروق بين الغدتين إلى اختلاف الجهد والنشاط الذي تقوم به كل غدة، حيث تفرز الغدة النكفية 25% من كمية اللعاب، في حين تفرز الغدة تحت الفك 60% منه، وتفرز الغدة تحت اللسان 5% [101]، ومن المعروف أن أحد وظائف الخلية العضلية البشروية هو دعم الخلايا العنبية أثناء العملية الإفرازية، كما أن إفراز الغدة تحت الفك أثناء أوقات الراحة، وهي الفترات الأطول مقارنة مع فترات الإثارة، يفوق إفراز النكفة بعشرة أضعاف[1]، ولذا فقد تكون الفعالية التكاثرية الزائدة لها في الغدة تحت الفك عائدةً إلى الجهد الأكبر الذي تقوم به الغدة مقارنة مع الغدة النكفية، كما أن نوع المفرز الغدي في الغدة تحت الفك قد يعزز هذه الفروق بين الغدتين، نظراً لطبيعته المخاطية اللزجة، وبالتالي فهو يحتاج لقوة أكبر حتى يفرز مقارنة مع مفرز النكفة المصلي المائي، ومن جهة أخرى، فقد فسر Takahashi [52] الفعالية التكاثرية الزائدة للخلية العضلية البشروية في الغدة النكفية مقارنة مع الغدة تحت الفك، عند الجرذان في حالة الربط التجريبي، فسر ذلك بأن الخلايا العضلية البشروية في الغدة تحت الفك هي الأكثر، وبالتالي فهي ليست بحاجة لزيادة تكاثرها كما هو الحال في النكفة. وإذا عدنا إلى الغدد اللعابية عند البشر، وجدنا أن الأقنية المقحمة في الغدة النكفية هي الأكثر عدداً والأطول مقارنة مع الغدة تحت الفك [101،1]، و الخلية العضلية البشروية تترافق مع هذه الأقنية، فقد تكون هي الأكثر أيضاً في النكفة، لذا فقد تعود الفروقات بين الغدتين أيضاً إلى اختلافٍ في عدد الخلايا العضلية البشروية بين الغدتين، والذي ربما يكون في النكفة أعلى منه في تحت الفك، وبالتالي فهي ليست بحاجة لزيادة تكاثرها كما هو الحال في الغدة تحت الفك. ومن جهة أخرى نجد أنه كلما صغر حجم الغدة أصبحت الأقنية المقحمة أقل وضوحاً، فهي الأكثر والأطول في النكفة، وتقصر وتقل في تحت الفك، وبالكاد يمكن تمييزها أو تنعدم في الغدة تحت اللسان، وفي الغدد اللعابية الصغيرة[101،1]، فيبدو أنه كلما صغرت الغدة أصبح هذا الجزء من الوحدة الوظيفية

أقل تمايزاً، وبما أن تمايز النسج يرتبط عكساً مع الفعالية التكاثرية لخلاياها[37]، فقد تكون الخلايا العضلية البشروية في الغدة تحت الفك أقل تمايزاً من نظيرتها في النكفة ولذا فهي أعلى تكاثراً. وبلغت النسبة عند Ihrler في الغدة النكفية (0.2%) بينما بلغت لدينا (0.9%) وقد يعود هذا الاختلاف إلى أنه استخدم الــKi67 في دراسته بينما نحن استخدمنا الــPCNA، كما قد يعود إلى الاختلاف في نظام التلوين المضاعف المستخدم، حيث استخدم Ihrlerنظام (LSAB Kit) بينما استخدمنا نظام EnVision system.

2. السرطان المخاطي المشبه بالبشروي: Mucoepidermoid Carcinoma

لم نجد أيّ تمايزٍ للخلية العضلية البشروية في هذا السرطان، وكانت الخلايا سلبية الأكتين. لقد اعتبر Dardick[24,23]أن الخلايا المتوسطية في السرطان المخاطي المشبه بالبشروي تكافئ الخلايا العضلية البشروية المعدلة في الورم الغدي متعدد الأشكال، وهذا ما وافقه Bahn [25] في أن الخلايا العضلية البشروية متورطة في هذا السرطان، ولــ Dardick نظرية وهي: أن الخلايا القاعدية هي شكل معدل عن الخلايا العضلية البشروية[68،67](نقلاً عن32)، إلا أن التلوين المناعي ينافي ذلك، فقد أثبت Ogawa من خلال الاعتماد على السيتوكيراتينات أن هذه الخلايا هي خلايا لمعية غير ناضجة (Immature luminal cells) ولا ترتبط بالخلايا العضلية البشروية[69،32]، كما أثبت Ihrler[53] ذلك حيث وجد أن الخلايا القاعدية في النسيج الغدي الطبيعي لم تعبر عن الأكتين والذي يعد الواسم النوعي للخلية العضلية البشروية الطبيعية[33،32]، وأصبح واضحاً أن هذه الخلايا تختلف عن الخلايا العضلية البشروية، ويقتصر وجودها على الأقنية المفرغة والمخططة فقط، بينما يقتصر وجود الخلايا العضلية البشروية على العنبات والأقنية المخصورة[70،3،1]، كما أثبت Ihrler[53]من خلال التلوين المضاعف للخلايا القاعدية أن هذه الخلايا هي الأعلى تكاثراً (3.2%) في الغدد الطبيعية مقارنة مع الخلايا العضلية البشروية (0.2%) والعنبية(2%) والمخصورة (0.8%) والأسطوانية (0.2%)، وأنها هي المسؤولة عن تجدد الأقنية المخططة والمفرغة، وأن الحؤول الحرشفي(Squamous cell metaplasia) والمخاطي (Mucous cell metaplasia) وفرط التصنع القاعدي (Basal cell hyperplasia) الذي يصيب الغدد اللعابية يقتصر على هذا الجزء من الوحدة الغدية، وبالتالي فإن الخلايا القاعدية تمثل خلايا احتياطية (Reserve

cells) لها قدرة عالية على التكاثر والتمايز إلى أنواع متعددة[71،53،33]، كما أن نظرية الـــ(Bicellular theory) تعتبر أن السرطان المخاطي المشبه بالبشروي ينشأ عن خلايا قاعدية في الأقنية المفرغة[16]، لديها القدرة على أن تتمايز إلى خلايا حرشفية ومخاطية، كما ذكرت نظرية الـــ (Multicellular theory) أن هذا السرطان ينشأ من الخلايا المفرغة نفسها[17]، وبالتالي نجد أن مشاركة الخلايا العضلية البشروية في هذا السرطان لا تصح في كلا النظريتين، وبالتالي نتفق مع Martinez[19] في أن منشأ هذا السرطان بعيد كل البعد عن مكان وجود الخلايا العضلية البشروية، ونتفق مع Prasad[45] الذي استخدم ثلاث واسمات للخلية العضلية البشروية وهي الأكتين العضلي الأملس ألفا (αSMA)، والميوزين العضلي الأملس ذو السلاسل الثقيلة (SMMS)، والكالبونين (Calponin) وكانت جميعها سلبية في السرطان المخاطي المشبه بالبشروي، وذكر أن الخلايا المتوسطية هي أقرب للخلايا القاعدية شكلياً ومناعياً، كما دحض نتيجة Bahn[25] لأنه اعتمد على S100 والذي ثبث الآن أنه لا يشكل واسماً نوعياً للخلية العضلية البشروية بل شوهدت إيجابيته أيضاً في الخلايا العنبية والقنيوية[30]، كما أثبت كل من Regezi[72] وMatsushima[73] النتيجة نفسها، ونحن نتفق معهم في ذلك. كما أن هذا السرطان يفتقد إلى المفرزات التي تميزت بها الأورام الحاوية على الخلية العضلية البشروية والتي تعد دليلاً مهماً على التمايز العضلي البشروي وفي التشخيص التفريقي له[74،20]. ولذلك فمن المعتقد أن خلايا الأقنية المفرغة أو الخلايا القاعدية (وهي نوعٌ آخر يختلف عن العضلية البشروية) هي المسؤولة عن نشوء السرطان المخاطي المشبه بالبشروي.

3- السرطان الكيسي المشبه بالغدي: Adenoid Cystic Carcinoma

- كانت هناك فروقٌ إحصائية واضحة بين تكاثر الخلية العضلية البشروية في العينة الطبيعية (1.58%) وبين الخلية العضلية البشروية الورمية أو المعدلة (15.4%) وذلك في كلٍّ من الغدتين.
- وكانت هناك فروقٌ إحصائية بين تكاثر الخلايا **العضلية البشروية** في النمط الأنبوبي(18.5%)، وبين تكاثر **الخلايا البشروية** في النمط نفسه (14.8%)، وأيضاً وجدت هذه الفروق في النمط الغربالي، حيث تكاثرت الخلية **العضلية البشروية** بنسبة (12.4%) **والخلايا البشروية** بنسبة (14.9%)، ولم توجد أية فروق بين تكاثر الخليتين

في مجموع الغدتين، وفي الغدة الواحدة عند إهمال نمط الورم، حيث بلغت نسبة تكاثر الخلية العضلية البشروية (15.4%) وبلغت نسبة الخلية البشروية (14.8%).

- كانت هناك فروقٌ إحصائية بين فعالية الخلايا الورمية (بغض النظر عن نوعها) بين الأنماط الثلاث كالتالي: غربالي (13.6%)، أنبوبي (16.1%)، وصلد (28%)، ووجدت هذه الفروق أيضاً في الخلية العضلية البشروية حيث بلغت في النمط الأنبوبي(18.5%) وفي الغربالي(12.4%)، وتقاربت نسب تكاثر الخلية البشروية في النمط الغربالي والأنبوبي في الغدتين إذ بلغت في النكفة (مثقب 7.5%، أنبوبي 8.4%) وفي الغدة تحت الفك (غربالي 19.8%، أنبوبي 19%).
- كانت هناك فروقٌ إحصائية بين فعالية الخلايا الورمية عموماً(بغض النظر عن كونها عضلية بشروية أو بشروية وبغض النظر عن الأنماط الورمية) في الغدة تحت الفك(22%) والغدة النكفية (13.5%)، ووجدت هذه الفروق أيضاً في فعالية الخلية العضلية البشروية، فقد بلغت في الغدة تحت الفك(19.9%) بينما في الغدة النكفية (8.7%)، مهما كان نمط الورم.
- كانت إيجابية الأكتين أقرب ما تكون إلى اللمع الكيسية الكاذبة في النمط الغربالي، بينما شكلت في النمط الأنبوبي طبقة خارجية تحيط بالخلايا البشروية، وكان الأكتين سلبياً في النمط الصلد.

1.3.الخلايا:

يعد الـــ PCNA من الواسمات التكاثرية التي تزداد نسبته مع ازدياد خباثة الورم أو درجته[46،47،48،57،75]، وتعد الفعالية التكاثرية من الآليات الحيوية الهامة في عملية التكون الورمي[76]، ولها أهمية إنذارية عالية في معظم السرطانات[77]، ولذا فإن الفروق الكبيرة بين تكاثر الخلية العضلية البشروية في كل من العينة الطبيعية والعينة الورمية، هي فروق منطقية نظراً للطبيعة الورمية لهذه الخلية في السرطان الكيسي المشبه بالغدي.

إن تمايز النسج الطبيعية يرتبط ارتباطاً عكسياً مع الفعالية التكاثرية لخلاياها، وإن فقدان الخلايا الورمية لقدرتها على التكاثر يدل على أن الورم عالي التمايز(Well-differentiated)[37،78،79]، ونجد مثالاً لذلك السرطان المخاطي المشبه بالبشروي[57]، والسرطان البشروي شائك الخلايا[80]، وفي دراسةٍ لـــNagao[81]على السرطان العضلي

البشروي في الغدد اللعابية، وجد فيها أن الحالات التي كانت فيها الخلايا العضلية البشروية أقل تكاثراً، هي التي كانت أقلُّ خباثةً، ووجد أن الحالات ذات الفعالية التكاثرية العالية قد ترافقت بإنذارٍ سيء، وفي دراسة أخرى لـــ Savera[20] على السرطان العضلي البشروي أيضاً، وجد فيها أن معظم الحالات قد تميزت بالنمو العقيدي، وفسر عجز الخلايا الورمية عن الارتشاح المنتشر إلى اللحمة بالخصائص التي تميزت بها هذه الخلايا، كالإفراز الغزير للقالب العضوي وتخزينه، والإنتاج العالي لكابحات البروتيناز، وكبح تكون الأوعية، وإن التباين في سلوك هذا الورم يعود إلى التعديل الذي يطرأ على هذه الخصائص أثناء التحول الورمي، فإذا ما عُبّرَ عن هذه الصفات بوضوح في السرطان، فإنها ستلغي أو تحد من عدوانيته، والعكس بالعكس، لذا فإن الفروق بين فعالية الخلية العضلية البشروية والخلية البشروية في النمط الأنبوبي، تدلُّ أن الخلية العضلية البشروية أقل تمايزاً من البشروية، أو أن التحول قد بدأ في هذه الخلية، وأثرت إصابتها فيما بعد على الخلية البشروية، و يبدو أن التحول الورمي قد عَّدلَ كثيراً من صفاتها المضادة للورم، وهذا ما وجده Fonseca[82] في دراسته للسرطان البشروي العضلي البشروي (Eipthelial-myoepithelial carcinoma) الذي يحتوي أيضاً على خلايا بشروية وخلايا عضلية بشروية، واستنتج أن نمو هذا السرطان وعدوانيته تقوم بشكلٍ أساسي على تكاثر الخلايا العضلية البشروية، ونحن نتفق مع Savera في تفسيره، فمن المعلوم أن عملية التسرطن عملية متعددة الخطوات، وأن الخلايا الورمية ذاتها ليست على مقدرةٍ واحدةٍ من الغزو والاستعمار، فعدد الطفرات في الخلية الورمية الواحدة، واختلاف المورثات الطافرة بين خلية ورمية وأخرى، وترتيب حدوث الطفرات في هذه المورثات، هو الذي يعدل من صفات الخلايا الورمية وبالتالي يحدد فعاليتها، وقد يفسر هذا الانتقالات المتأخرة في بعض السرطانات لأن الذراري (Subclones) المؤهلة لذلك لم تظهر بعد، وهذه الظاهر تدعى بتقدم الورم (Tumor progression)[83]، ومما يؤيد هذه النتيجة، دراسة Cardoso[84] الذي استخدم CD105 (Neoangiogenesis marker) لتقييم التشكل الوعائي في سرطانات الغدد اللعابية ذات الانتقالات المتعددة، ووجد أن الخلايا العضلية البشروية قد لعبت بعض الدور في التحكم بتشكل الأوعية، وهذا قد يفسر الاستعمارَ المتأخرَ والنموَّ البطيء[87،86،85،13] للسرطان الكيسي المشبه بالغدي، إلا أن Cardoso وجد أن السرطان الكيسي المشبه بالغدي الذي أبدى إيجابية CD105 كان ذا قدرة عالية على الاستعمار، وهذا يؤكد أن السؤال الأهم هو:

إلى إي مدى بقيت الخلايا العضلية البشروية تؤدي وظائفها الحميدة؟

وما هو مقدار الخلل الذي أحدثه التحول الورمي فيها، وليست العبرة في وجودها فقط[60].

وقد ذكر Polyak[43] أن التفاعلات نظيرة الصماوية (Paracrine interactions) بين الخلايا العضلية البشروية و البشروية تلعب دوراً هاماً في ترسيخ استقطاب الخلايا البشروية واستقرارها وبالتالي تكبح غزو الخلايا البشروية وهجرتها، وهذا جزء من الوظائف التي جعلت الخلايا العضلية البشروية تسمى بكابحات الورم الطبيعية (Natural tumor suppressors)، إلا أن هذه الخصائص تضعف تدريجياً أثناء تقدم الورم مما يؤدي إلى الغزو، أو أن إصابة الخلية العضلية البشروية هي التي أدت إلى ذلك، وهذا ما أطلق عليه Polyak الإفلات والتحرير (Escape&Release)، فإما أن طفرة الخلايا البشروية هي التي جعلتها تمزق طبقة الخلايا العضلية البشروية والصفيحة القاعدية وتتسرب إلى اللحمة (Escape)، أو أن طفرة الخلايا العضلية البشروية هي التي حررت الخلايا البشروية من قيدها(Release). ويبدو أنه عندما يحدث السرطان يكون الخلل قد اعترى الخليتين سوياً. كما أثبت Gudjonsson[21] أن قدرة الخلايا العضلية البشروية على الحفاظ على استقطاب الخلايا البشروية مرتبط بقدرتها على تصنيع اللامنين1، والتي تضعف أو تزول أثناء التسرطن، كل هذه الدراسات تشير أن التحول الورمي، سواء حدث في الخلايا البشروية أو الخلايا العضلية البشروية، فإنه يؤثر على خصائص الخلايا العضلية البشروية المضادة للورم، ويمكن أن نشبه هذه الخلية بالمورثة P53 (حارسة الجينوم) التي تؤذن طفرتها بحدوث الورم[83]، ومع ذلك فإن الآمال المستقبلية العلاجية تعتمد على هذه الخصائص[41،43]، ومن هذه المعالجات، المعالجة المضادة لتوليد الأوعية (Antiangiogenesis Therapy)، واستخدام كوابح حالاّت البروتين (Protease inhibitors)[83]، وهذه من الخصائص التي تميز الخلية العضلية البشروية.

2.3.الأنماط:

لقد اختلفت الدراسات بين النمط المثقب والأنبوبي، فقد لاحظ Seifert أن النمط الأنبوبي لم يترافق بانتقالاتٍ إلى العقد اللمفية، بينما وجدت هذه الانتقالات في 4% من النمط الغربالي، و33% من النمط الصلد، أما الانتقالات البعيدة فكانت في النمط الأنبوبي بنسبة33%، والنمط الغربالي بنسبة58%، والصلد بنسبة67%، إلا أنه ذكر أن الشلل الوجهي قد ترافق مع

الغربالي بنسبة 20%، الأنبوبي بنسبة 40%، والصلد بنسبة 50%[85]. كما ذكر Painter [88] أن معدل النكس كان الأعلى في النمط الصلد، ويتلوه النمط الغربالي، فالأنبوبي، إلا أنَّ الإنذار الأفضل ترافق مع النمط الغربالي.

كما ذكر Perzin[89] أن النمط الأنبوبي هو النمط الأكثر تمايزاً في السرطان الكيسي المشبه بالغدي، والأفضل إنذاراً، بينما النمط الصلد هو الأسوأ إنذاراً، ويأتي النمط الغربالي في الوسط. ووافقه في ذلك Chomette[90] حيث ذكر أن النمط الصلد هو الأسوأ دائمًا، وترافق بانتقالات، ونكس، وموت، بينما كان النمط الغربالي ذا إنذار متوسط وأفضل من الصلد، لكنه أسوأ من الأنبوبي الذي بقي فيه جميع المرضى على قيد الحياة لمدة 8 سنوات. بينما وجد [91] Nascimento في دراسته أن النمط الغربالي هو الأفضل إنذاراً، يتلوه الأنبوبي، فالصلد.حيث وجد أن معدل البقيا لمدة خمس سنوات كان 13.3% في النمط الصلد، و 52.9 % في الغربالي، و33.3% في الأنبوبي، وتوفي جميع المرضى خلال عشر سنوات في كل من النمط الصلد والأنبوبي، بينما كان معدل البقيا 14.3% في المثقب. ووافقه في ذلك Perez [92] الذي وجد أن معدل البقيا كان الأعلى مع النمط الغربالي. بينما صنفت أبحاثٌ أخرى درجة السرطان الكيسي المشبه بالغدي حسب نسبة النمط الصلد فيه، فعندما يسيطر النمط الصلد اعتبرت أن السرطان في الدرجة الثالثة (High grade)، ويكون في الدرجة الأولى عندما يسيطر النمط الغربالي أو الأنبوبي (Low grade)، ويكون في الدرجة الثانية أو المتوسطة عندما تتساوى نسبة كل من النمط الصلد والنمط الغربالي أو الأنبوبي[93] (نقلاً عن11)، كما صنفت الــAFIP السرطان الكيسي ذو النمط الصلد على أنه عالي الدرجة، بينما صنفت كل من النمط الغربالي أو الأنبوبي على أنهما متوسطي الدرجة[94].

بينما صنف Szanto [95] السرطان الكيسي المشبه بالغدي كالتالي:

الدرجة الأولى: نمط أنبوبي وغربالي دون نمط صلد وكانت أورامها هي الأصغر حجماً،

الدرجة الثانية: نمط غربالي لوحده أو مختلط مع نمط صلد بنسبة أقل من 30%.

والدرجة الثالثة: هي التي يسيطر فيها النمط الصلد وكانت أورامها هي الأضخم والأكثر نكساً. وكان معدل البقيا لمدة 15 سنة كالتالي:39% مع الدرجة الأولى، و26% مع الدرجة الثانية، 5%مع الدرجة الثالثة. وقد تعود هذه الاختلافات بين الدراسات إلى أن النمط النسيجي ليس الوحيد الذي يحدد إنذار الورم، بل هناك عوامل متعددة منها الدرجة السريرية للورم عند اكتشافه، وعمر المريض، ومدة ظهور الأعراض، والموقع التشريحي، ونوع المعالجة،

وحواف الورم السليمة[93،92،91]. ولقد وجدنا في بحثنا الحالي أن نسب الخلية البشروية في النمطين كانت متقاربة في الغدتين إذ بلغت في النكفة (غربالي 7.5%، أنبوبي 8.4%)

وفي الغدة تحت الفك (غربالي 19.8%، أنبوبي 19%). بينما كانت الفروق في نسب التكاثر بالنسبة للخلية العضلية البشروية، مما يدلّ أن هذه الخلية هي التي تلعب الدور الأهم في هذا السرطان. وقد أثبت Fonseca[82] نتيجة مشابهة لذلك في دراسته للسرطان البشروي العضلي البشروي (Eipthelial-myoepithelial carcinoma)، ومن هنا فمن المعتقد أن النمط الغربالي هو النمط الأكثر تمايزاً، لأنه النمط الأكثر غزارة بالمفرزات التي تمثل الغليكوزرأمينوغليكانات ومواد الصفيحة القاعدية، وهي من منتجات الخلايا العضلية البشروية في السرطان الكيسي المشبه بالغدي[35،18،15،14،13،12] وهي المواد التي تفرزها في الحالة الطبيعية، مما يدل على أنها مازالت على درجة عالية من التمايز في النمط المثقب الذي يتألف في معظمه منها[35]، ومما يؤكد ذلك أيضاً أن فعاليتها التكاثرية في هذا النمط كانت أقل من الخلية البشروية بعكس النمط الأنبوبي، وهذه المواد هي ذاتها التي تفرزها هذه الخلية في الورم الغدي متعدد الأشكال والتي تعد دليل تمايزٍ وسلامة[30] وقد تبلغ أحياناً درجة عالية من الغزارة يختلط فيها تشخيص هذا السرطان مع الورم الغدي المختلط[85]، وذلك بعكس النمط الأنبوبي والنمط الصلد [74]، بل إنّ هذه المفرزات الزائدة من قبل الخلايا العضلية البشروية هي المسؤولة عن تشكل هذه اللمع الكاذبة، والتي تمتلئ بهذه المفرزات[74]. كما علّلَ Eneroth وزملاؤه الإنذار الجيد للنمط المثقب مقارنة بالصلد، بوجود هذه المواد[96] وقد استنتج Santucci[97]أنه كلما أزداد عدد هذه اللمع في المليمتر المربع، ازداد معه معدل البقيا، فكلما كانت الخلية أقرب إلى أصلها، كانت أقرب للتعبير عن وظائفها الطبيعية، وهذا ما نجده مثلاً في الدرجة الأولى من السرطان شائك الخلايا حيث مازالت الخلايا البشروية تصنع القرنين[98]. وبالتالي فإن الخلايا العضلية البشروية في النمط المثقب أكثر تمايزاً من نظيرتها العضلية البشروية في النمط الأنبوبي، ولذا فإن فعاليتها التكاثرية أقل.

وكانت الخلايا الورمية سلبية تجاه الأكتين في النمط الصلد، ونتفق في ذلك مع Furuse [30]الذي ذكر أن إيجابية الأكتين كانت فقط في النمطين المثقب والأنبوبي، وPrasad[45] حيث كانت تعبيرية الأكتين بؤرية وحول الأعشاش الورمية فقط. ولذا فنحن بحاجة لواسمات أخرى للتمييزبين الخلايا البشروية والعضلية البشروية لتحديد الخلايا الأكثر تكاثراً في هذا النمط، ونفسر غياب الأكتين في النمط الصلد بأن الخلايا العضلية البشروية بلغت درجة عالية من

الخباثة وفقدت خواصها المعروفة، ومنها تصنيع الأكتين، وهناك شبه إجماع من الأبحاث على أن هذا النمط يمثل درجة عالية من الخباثة، وتقل فيه البنى القنيوية واللمع الكاذبة كما تنعدم فيه مفرزات الخلايا العضلية البشروية، وتكثر فيه علائم الكشم والانقسامات والتموت(95،91،90،89،85).

وقد درس عدة باحثين الفعالية التكاثرية في السرطان الكيسي المشبه بالغدي الناشئ عن الغدد اللعابية باختلاف أنواعها. فقد وجد Yang (46) أن نسبة الـــ PCNA في الغدد اللعابية السليمة ككل1.1%، وفي النمط الأنبوبي والغربالي 8.9%، وفي النمط الصلد 24.9%.

ووجد Cho(47) أن نسبة الـــ PCNA (في عموم الغدد) بلغت في كل من النمط الغربالي والأنبوبي12%، وفي النمط الصلد 18.9%. ووجد Fonseca(75) أن نسبة الـــ PCNA في النمط الغربالي 21.32%، وفي الأنبوبي 22.36%، والصلد 26.68%. بينما كانت النسب لدينا كالتالي: 13.6% غربالي، 16.6% أنبوبي، 28% صلد. وبشكل عامٍ يوجد اختلافات كثيرة بين طريقة إنجاز بحثنا والبحوث السابقة، من حيث طريقة عد الخلايا، وتقسيم الأنماط الورمية، والاختبارات الإحصائية، و حجوم العينات، وطريقة التلوين المناعي، إلا أنه نتفق معهم في أن نسبة الـــ PCNA الأعلى كانت في النمط الصلد، ونتفق مع البعض(75) في أن هذه النسبة كانت أخفض في النمط الغربالي مقارنةً بالأنبوبي، والبحث الوحيد الذي أخذ التنوع الخلوي بعين الاعتبار هو لـــ Fonseca(75) في دراسته على سرطانات الغدد اللعابية الحاوية على تمايز عضلي بشروي، ووجد أن نسبة الـــ PCNA كانت منخفضة في الأورام التي تسيطر فيها الخلية العضلية البشروية بنمطها الرائق (20.31%)، مقارنةً مع الأورام التي تسيطر فيها الخلايا البشروية (Ductal) 20.44%. كما وجد أن الفعالية التكاثرية الأعلى كانت في الخلية القاعدية (Basal) 26.56%، وهي التي تلونت بالواسمات البشروية كالسيتوكيراتينات، والواسمات العضلية البشروية كالأكتين، ونعتقد أن هذه الخلية هي أيضاً خلية عضلية بشروية لأنه بات من المعروف الآن أن هذه الخلية تتلون بجميع تلك الملونات(18) وقد ذكرFonseca أن نسبة الـــ PCNA كانت مرتفعة في السرطان الكيسي المشبه بالغدي الحاوي على الخلايا القاعدية، مقارنةً مع الأورام التي تتألف من الخلايا البشروية والرائقة.

3.3.الغدد:

لقد ذكر Neville [12] أن السرطان الكيسي الناشئ على حساب الغدة تحت الفك قد ترافق بالإنذار الأسوأ، وكان يتضخم بسرعة كبيرة قبل أن يلاحظه المرضى[15]، كما وجد Eneroth أن الأنتقالات كانت هي الأعلى في الغدة تحت الفك مقارنة مع النكفة وقبة الحنك، وعلل ذلك بتصريفها اللمفي ومدة ظهور الأعراض قبل العمل الجراحي، وكانت سرطاناتها هي الأسوأ إنذاراً[99،100]، ومن المعلوم أيضاً أن خباثات الغدة تحت الفك تبلغ ضعف خباثات الغدة النكفية عموماً[12،85،100] بينما لم يجد Cho[47]أي ارتباطٍ بين موقع الورم وإنذاره.

وقد لاحظ Szanto[95] أن السرطان الكيسي المشبه بالغدي ذو الدرجة الثالثة والتي يغلب فيها النمط الصلد، لاحظ أن حدوثه يكثر في الغدة تحت الفك، وهذه الأبحاث تتفق مع النتيجة التي وصلنا إليها من حيث أن الفعالية التكاثرية– للخلايا الورمية عموماً والخلايا العضلية البشروية خصوصاً– في الغدة تحت الفك أعلى منها في النكفة، وقد تعود هذه الفروق بين الغدتين بالنسبة للخلية العضلية البشروية إلى أن فعالية الخلايا العضلية البشروية في الغدة تحت الفك السليمة أعلى منها في النكفة، مما يجعل الخلايا العضلية البشروية الورمية فيها أعلى قدرةً على التكاثر من نظيرتها في الغدة النكفية.

4.3.التوزع:

نتفق مع Furuse[30] و Prasad[45] من حيث توزع الأكتين في الأنماط الثلاثة، وقد يعود التباين في شدة إيجابيته إلى أن الخلايا الورمية لا تكون على درجة واحدة من التمايز، وذلك بسبب التحول الورمي الذي يعدل من خصائصها[30].

الباب الخامس

الاستنتاجات

Conclusions

الاستنتاجات:

1. إن الخلايا العضلية قادرة على التكاثر وبالتالي فهي معرضة للتحول الورمي وهذا يتفق مع نظرية الـــ (Multicellular theory).

2. ليس للخلايا العضلية البشروية أي دور في السرطان المخاطي المشبه بالبشروي.

3. في حين أنها تلعب الدور الأساسي في السرطان الكيسي المشبه بالغدي مقارنةً مع نظيرتها البشروية.

1.3. إن النمط الغربالي هو النمط الأكثر تمايزاً في حين أن النمط الصلد هو الأقل تمايزاً.

2.3. إن الخلية العضلية البشروية الأكثر تمايزاً توجد في النمط الغربالي، وفي السرطانات الناشئة عن الغدة النكفية.

الباب السادس

المقترحات والتوصيات

Suggestions and Recommendations

- نوصي بالاهتمام أكثر بالدراسات الوبائية الخاصة بمجتمعنا، والتشديد على أخذ البيانات الكاملة للمرضى، لما لذلك من أهمية كبيرة في إغناء الأبحاث النسيجية، وربطها بالنواحي السريرية للمرضى.

- نوصي بإيجاد صيغة معينة للتعاون بين المؤسسات الصحية المختلفة التابعة لوزارة التعليم العالي، ووزارة الصحة، بحيث يصبح الأمر تلقائياً دون معوقات، لما لذلك من دورٍ كبير في اختصار جهد الباحث ووقته، وفي توفير العينات لمعظم الأبحاث.

- نقترح إجراء المزيد من الأبحاث على هذه الخلية ذات الخصائص المتميزة، خصوصاً في السرطان الكيسي المشبه بالغدي.

الباب السابع

المراجع

References

References

1. Hand AR. Salivary glands. In: Nanci A. *Ten Cate ´s Oral Histology; Development, Structure, and Function*. 6th ed. In. ed. Mosby. 2003:299-328.

2. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology. 10th ed. USA;The McGraw-Hill Companies. 2003. 87-325-328.

3. Garant PR. Oral cells and Tissues.1st ed. Chicago; Quintessence Publishing Co. 2003: 239-269.

4. Sternlicht MD, Barsky SH. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. Med Hypotheses. 1997;48:37–46.

5. Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The Human Myoepithelial Cell Is a Natural Tumor Suppressor. Clinical Cancer Research.1997;3:1949-1958.

6. Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells:Autocrine and Paracrine Suppressors of Breast Cancer Progression.Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2005;10:249-260.

7. Deugnier MA, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. Breast Cancer Research. 2002;4:224-230.

8. Sternlicht MD, Safarians S, Rivera SP, et al. Characterizations of the extracellularmatrix and proteinase inhibitor content of human myoepithelial tumors. Lab Invest. 1996;74:781–796.

9. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. France :IARC;2005. 209 p.

10. Eveson JW, Auclair P, Genpp DR, El-Naggar AK. Tumor of the salivary gland: Introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* France :IARC;2005:209-281.

11. Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumors.oral disease.2002;8:229-240.

12. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquets JE. Oral and Maxillofacial pathology. 3rd ed. China:Saunders; 2009: 453-506.

13. Marx RE, Stern D. Oral and Maxillofacial Pathology; A Rationale for Diagnosis and Treatment.1st ed. Chicago: Quintessence Publishing; 2003.chapter12:527.

14. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RC. Oral pathology ; Clinical, pathologic correlations. 5th ed. In. ed. Saunders. 2008:195.

15. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki JP. Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. 2nd ed. Chaina; Mosby. 2003:347p.

16. Hana EY, Suen JY. Malignant tumors of the salivary gland. In: Myers EN, Suen JY, Myers JN, Hanna EY, eds. *Cancer of the head and neak*. 4th ed. USA: Elsevier Science;2003:475-509.

17. Dardick, I. Mounting evidence against current histogenetic concepts for salivary gland tumorigenesis. European Journal of Morphology. 1998; 36; 257-261.

18. Savera AT, Zarbo RJ. Defining the Role of Myoepithelium in Salivary Gland Neoplasia. Adv Anat Pathol.2004;11:69–85.
19. Martinez-Madrigal F, Bosq J, Casiraghi O. Major salivary glands. In: Mills SE, edr *Histology For Pathologist*.3rd ed.Philadelphia:Lippincott Williams,Wilkins. 2007:454-456.
20. Savera AT, Sloman A, Huvos AG, et al. Myoepithelial carcinoma of the salivary glands: a clinicopathologic study of 25 patients. Am J Surg Pathol. 2000;24:761–774.
21. Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. Journal of Cell Science. 2002; 115: 39-50.
22. Dardick I, Thomas MJ, van Nostrand AW. Myoepithelioma—new concepts of histology and classification: A light and electron microscopic study. Ultrastruct Pathol. 1989;13:187–224.
23. Dardick I, van Nostrand AW. Myoepithelial cells in salivary gland tumors—revisited. Head Neck Surg. 1985;7:395–408.
24. Dardick I, Gliniecki MR, Heathcote JG, et al. Comparative histogenesis and morphogenesis of mucoepidermoid carcinoma and pleomorphic adenoma. Virchows Archiv A Pathol Anat. 1990;417:405–417.
25. Kahn HJ, Baumal A, Mark A, Dardic I, Van Nostarand AW. Myoepithelial cells in salivary gland tumar. An immunohistochemical study. Arch Pathol lab Med. 1985 Feb;109(2):190-5.
26. Dardick I. Myoepitheliomas. Definitions and diagnostic criteria. Ultrastruct Pathol. 1995;19:359–369.
27. Dardick I, Cavell S, Boivin M, et al. Salivary gland myoepithelioma variants. Histological, ultrastructural, and immunocytological features. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1989;416:25–42.
28. Hasegawa M, Hagiwara S, Sato T, Jijiwa M, Murakumo Y, Maeda M. et al. CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal glands and prostate basal cells.Pathology International 2007; 57: 245–250.
29. Reis-Filho JS, Schmi FS. Taking Advantage of Basic Research: p63 Is a Reliable Myoepithelial and Stem Cell Marke. Advances in Anatomic Pathology 2002; 9: 280–289.
30. Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Arauijo VC. Myoepithelial Cell Markers in Salivary Gland Neoplasms. Int J Surg Pathol.2005;13:57-65.
31. Jones H , Moshatel F, Simpson RH. Immunoreactivity of a smooth muscle actin in salivary gland tumor: a comparison with S100 protein. J Chin Pathol. 1992;45:938-940.
32. Ogawa Y. Immunocytochemisty of Myoepithelial Cells in the Salivary Gland.Progr.Histochem.Cytochem.2003;38(4):343-426.

33. Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G. Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. J Histochem Cytochem.1988;36:659-663.
34. Goode RK, El-Naggar AK. Mucoepidermoidcarcinoma. In: Barnes L, Eveson J.W, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* France:IARC. 2005:219-220.
35. Peel RL, Seethala RR. Pathology of salivary gland disease. In: Myers EN , Ferris RL, eds. *Salivary Gland Disorders*.1st ed. Germany;Springer. 2007:59-64.
36. El-Naggar AK, Huvos AG. Adenoid cystic carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* France:IARC. 2005:221-222.
37. Mitchell RN, Corton RS. Repair. In: Kumar V, Abbas Ak, Fausto N, Mitchell RN, eds. *Robbins Basic pathology*. 8th ed. Philadelphia;Saunders. 2007:59-79.
38. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.7th ed. Saunders;2004:270-276.
39. Jia-xuan QI , Sheng-rong ZH, Sudhott H, Hildman H. Expression of Ki-67, PCNA in Parotid Tumors. Journal of US-China Medical Science. 2008;5(1):37-42.
40. Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. Histopathology 2007; 51:1–20.
41. Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial Cells: Their Origin and Function in Breast Morphogenesis and Neoplasia. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2005;10(3)261-272.
42. Clarke C, Sandle J, Lakhani S.R. Myoepithelial Cells: Pathology, Cell Separation and Markers of Myoepithelial Differentiation. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2005;10(3)273-280.
43. Polyak K, Hu M. Do Myoepithelial Cells Hold the Key for Breast Tumor Progression?. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2005;10(3)231-247.
44. Faraldo MM, Teuliére J, Deugnier MA. Myoepithelial Cells in the Control of Mammary Development and Tumorigenesis: Data From Genetically Modified Mice. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2005;10(3)211-219.
45. Prasad AR, Savera AT, Gown AM, Zarbo RJ. The Myoepithelial Immunophenotype in 135 Benign and Malignant Salivary Gland Tumors Other Than Pleomorphic Adenoma. Arch Pathol Lab Med. 1999;123:801-806.
46. Yang L, Hashimura K, Qin C, Shrestha P, Sumitomo S, Mori M. Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen in salivary gland tumours: an assessment of growth potential. Virchows Archiv A Pathol Anat .1993;422:481-486.
47. Cho Kj, Lee SS, Lee YS. Proliferating cell nuclear antigen and C-ERBB-2 Oncoproten expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. Head Neak 1999:21:414-419.

48. Zhu Q, White FH, Tipoe GL. The Assessment of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunostaining in Human Benign and Malignant Epithelial Lesions of the Parotid Gland. Oral Oncology1997: 33:29-35.
49. Ihrler S, Blasenbreu-Vogt S, Sendelhofert A, Rossle M, Harrison JD, Lohrs U. Regeneration in chronic sialadenitis: an analysis of proliferation and apoptosis based on double immunohistochemical labeling. Virchows Arch. 2004:444:356–361.
50. Daniele E, Tralongo V, Morello V, Nagar C, Russo A, Bazan V, Dardanohi G,Ciotta S, Nuara R, Tomasino R M. Pleomorphic adenoma and adenoid-cystic carcinoma: immunohistochemical assessment of proliferative activity in comparison with flow cytometric study. Cell prolif, 1996; 29: 153-162.
51. Takahashi S,Nakamura S, Shinzato K, Domon T,Yamamoto T, Wakita M. Proliferation and distribution of myoepithelial cells during atrophy of the rat sublingual gland. J Oral Pathol Med 2003: 32: 90–94.
52. Takahashi S, Nakamura S, Shinzato K, Domon T,Yamamoto T, Wakita M. Apoptosis and Proliferation of Myoepithelial Cells in Atrophic Rat Submandibular Glands.J Histochem Cytochem. 2001: 49:1557–1563.
53. Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Lang S, Blasenbreu-Vogt S, Löhrs U. A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. Virchows Arch. 2002:440:519–526.
54. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. Structure of the Human Gene for the Proliferating Cell Nuclear Antigen. The journal of biological chemistry 1989:264:7466-7472.
55. O´leary TJ, Frisman DM . Antigens. In: O´leary TJ, edr. *Advanced diagnostic methods in pathology; Principles, practice, and protocols*.1st ed.Philadephia: Saunders;2003:74-75.
56. Chang C, Ottavio L, Travali S, Lipson kE, Baserga R. Transcriptional and post-Transcriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. Moleculr and cellular biology 1990:10:3289-3296.
57. Cardoso WP, Denardin OV, Rapoport A, Araújo VC, Carvalho MB. Proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med. 2000; 118(3):69-74.
58. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Matthew P. Scott et al. Moleculr cell biology.5th ed.New York:W.H.Freeman and Company;2004:779-815.
59. Boenisch T. Handbook Immunochemical Staining Methods. 3rd .DakoCytomation, Carpinteria, California. 2001:26-31.
60. Costa AF, Demasi AP, Bonfitto VL, Bonfitto JF, Furuse C, Arajújo VC. Angiogenesis in salivary carcinoma with and without myoepithelial differentiation. Virchows Arch. 2008:453:359–367.
61. Norberg L, Stratis M, Dardick I. Quantitation and localization of cycling tumor cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas: an immunohistochemical analysis, J Oral Pathol Med. 1997; 26:l 24-128.

62. Batsakis JG, Regezi JA, Luna MA, El-Naggar A. Histogenesis of salivary gland neoplasms: a postulate with prognostic implications. J Laryngol Otol. 1989;103: 939–944.
63. Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford–Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. Oral Surg Med Pathol Radiol.1996;82:674–680.
64. Dardick I, Byard RW, Carnegie JA. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasmia in salivary glands. Oral Surgrey. Oral Medicine. Oral Pathology. 1990;69: 53-67.
65. Dardick I, Current status of histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine,1993;4: 639-677.
66. Blau HM, Baltimore D. Differentiation requires continuous regulation. J Cell Biol. 1991;112:781–783.
67. Dardick I, Parks WR, Little J, Brown DL. Characterisation of cytoskeletal proteins in basal cells of human parotid salivary gland ducts. Virchows Arch. 1988; 412:525–532
68. Dardick I, Rippstein P, Skimming L, Boivin M, Dairkee SH. Immunohistochemistry and Ultrastructure of Myoepithelium and Modified Myoepithelium of the Ducts of Human Major Salivary Glands: Histogenetic Implications for Salivary Gland Tumors. Oral Surg.Oral Med. Oral Pathol. 1987;64: 703-715.
69. Ogawa Y, Toyosawa S, Ishida T, Ijuhin N. Keratin 14 immunoreactive cells in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of salivary glands. Virchows Arch. 2000;437:58–68
70. Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Riederer A, Löhrs U. Lymphoepithelial duct lesions in Sjögren-type sialadenitis.Virchows Arch. 1999;434:315–323.
71. Palmer RM, Eveson JW, Gusterson BA. “Epimyoepithelial” islands in lymphoepithelial lesions. Virchows Arch. 1986 ;408:603–609.
72. Regezi JA, Zarbo RJ, Batsakis JG. Immunoprofile of mucoepidermoid carcinomas of minor salivary glands. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991;71:189–192.
73. Matsushima R, Nakayama I, Shimizu M. Immunohistochemical localization of keratin, vimentin and myosin in salivary gland tumors. Acta Pathol Jpn. 1988;38:445–454.
74. Dardick I. Histogenesis and morphogenesis of salivarygland neoplasms. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds. Surgical pathology of the salivary glands. Philadelphia: Saunders. 1991;108-128.
75. Fonseca I, Felix A, Soares J. Cell proliferation in salivary gland adenocarcinomas with myoepithelial participation. Virchows Arch. 1997; 430:227-232.
76. van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumours:interpretation and clinical value. J Clin Pathol. 1998; 51: 716–724.

77. Tubiana M, Courdi A. Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. Radiother Oncol 1989; 15: 1–18.
78. Hall PA. Differentiation, stem cells and tumour histogenesis. Recent Adv Histopathol. 1992 ;15:1-15.
79. Snell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. Lab Invest . 1994;70:6-22.
80. Kinugasa S, Tachibana M, Hishikawa Y, Abe S, Yoshimura H, Monden N, Prognostic Significance of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. Jpn J Clin Oncol. 1996;26:405-410.
81. Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Tajima Y, Matsuzaki O, Konno A, Kondo Y, Nagao K**.** Salivary Gland Malignant Myoepithelioma: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of Ten Cases. American Cancer Society. Cancer 1998;83:1292–9.
82. Fonseca I, Soares J. Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry in epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary glands. Arch Pathol Lab Med. 1993 Oct;117(10):993-5.
83. Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas Ak, Fausto N, Mitchell RN, eds. *Robbins Basic pathology*. 8th ed. Philadelphia:Saunders. 2007:173-223.
84. Cardoso SV, Souza KC, Faria PR, Eisenberg AL, Dias FL, Loyola AM. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. BMC Cancer 2009, 9:391.
85. Cawson RA, Gleeson MJ, Eveson JW. Pathology and Surgery of the Salivary glands. Isis Medical media.1997;130-135.
86. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, Goepfert H. Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck: Predictors of Morbidity and Mortality. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;125:149-152.
87. Sung M, Kim KH, Kim J, Min Y. Clinicopathologic Predictors and Impact of Distant Metastasis From Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;129:1193-1197.
88. Painter DM. Surgical pathology and fine needle aspiration cytopathology; salivary gland tumor. In: Norman JE, McGurk M, eds. *Color Atlas Text of the Salivary Glands; Diseases, Disorders and Surgery.* London: Mosby-Wolfe;1995. 76-78.
89. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands: a correlation of histological features and clinical course. Cancer. 1978;42: 265–282.
90. Chomette G, Auriol M, Tranbaloc P, Vaillant JM. Adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. Analysis of 86 cases. Clinico-pathological, histoenzymological and ultrastructural studies. Virchows Arch (Pathol Anat) 1982; 95:289–301.

91. Nascimento AG, Amaral ALP, Prado LAF, Kligerman J, Silveira TRP (1986). Adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a study of 61cases with clinicopathologic correlation. Cancer 57: 312–319.
92. Perez DE , Alves FD, Nishimoto IN, Almeida OP, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. Oral Oncology (2006) 42, 139–146.
93. Spiro RH. The controversial adenoid cystic carcinoma. Clinical considerations. In: McGurk M, Renehan A, eds. *Controversies in the management of salivary gland disease*. Oxford University Press: Oxford. 2001; pp. 207–211.
94. Ellis GL, Auclair PL . Classification of salivary gland neoplasms. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds. *Surgical pathology of the salivary glands*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1991;129–134**.**
95. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo E, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Cancer 1984;54:1062–1069.
96. Eneroth CM, Hjertman L, Moberger G, Wersall J. Ultrastructural characteristics of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. Arch Klin Exp 1968; 192:358-368.
97. Santucci M, Bondi R. New prognostic criterion in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. Am J Clin Pathol. 1989 Feb;91(2):132-6.
98. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquets JE. Oral and Maxillofacial pathology. 3rd ed. China:Saunders; 2009: 409-421.
99. Eneroth CM. Incidence and prognosis of salivary—gland tumours at different sites a study of parotid, submandibular and palatal tumours in 2632 patients. Acta Oto-laryngologia. 1970, Vol. 69, No. s263, Pages 174-178.
100. Eneroth CM. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular, and the palate region. Cancer 1971;27:1415-18.
101. Avery JK. Essentials of oral histology and embryology. 2nd ed. St. Louis, Mosby. 2000:186.

البيانات التفصيلية للبحث

الرقم	الحالة المرضية	نوع الغدة	نمط الورم	عدد الخلايا العضلية البشروية	PCNA+	PCNA -	النسبة المئوية	عدد الخلايا البشروية	PCNA+	PCNA-	النسبة المئوية	عدد الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية	PCNA+	PCNA-	نسبة وجود PCNA في الخلايا العضلية البشروية والخلايا البشروية معاً
1	غدة طبيعية	غدة نكفية	.	400	390	10	2.5	400	.	.	.	.	.	.	.
2	غدة طبيعية	غدة نكفية	.	400	395	5	1.25	400	.	.	.	.	.	.	.
3	غدة طبيعية	غدة نكفية	.	400	400	0	0	400	.	.	.	.	.	.	.
4	غدة طبيعية	غدة نكفية	.	400	400	0	0	400	.	.	.	.	.	.	.
5	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	386	14	3.5	400	.	.	.	.	.	.	.
6	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	400	0	0	400	.	.	.	.	.	.	.
7	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	385	15	3.75	400	.	.	.	.	.	.	.
8	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	400	0	0	400	.	.	.	.	.	.	.
9	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	394	6	1.5	400	.	.	.	.	.	.	.
10	غدة طبيعية	غدة تحت فكية	.	400	387	13	3.25	400	.	.	.	.	.	.	.
11	غدة ورمية	غدة تحت فكية	مثقب	400	292	108	27	400	260	140	35	800	552	248	31
12	غدة ورمية	غدة تحت فكية	مثقب	400	367	33	8.25	400	370	30	7.5	800	737	63	7.88
13	غدة ورمية	غدة تحت فكية	مثقب	400	361	39	9.75	400	332	68	17	800	683	107	13.4
14	غدة ورمية	غدة تحت فكية	أنبوبي	400	377	23	5.75	400	370	30	7.5	800	747	53	6.63
15	غدة ورمية	غدة تحت فكية	أنبوبي	400	270	130	32.5	400	311	89	22.25	800	581	219	27.38
16	غدة ورمية	غدة تحت فكية	أنبوبي	400	256	144	36	400	291	109	27.25	800	547	253	31.63
17	غدة ورمية	غدة نكفية	مثقب	400	378	22	5.5	400	375	25	6.25	800	753	47	5.88
18	غدة ورمية	غدة نكفية	مثقب	400	355	45	11.25	400	365	35	8.75	800	720	80	10
19	غدة ورمية	غدة نكفية	أنبوبي	400	377	23	5.75	400	373	27	6.75	800	750	50	6.25
20	غدة ورمية	غدة نكفية	أنبوبي	400	351	49	12.25	400	360	40	10	800	711	89	11.13
21	غدة ورمية	غدة تحت فكية	صلد	.	.	.	.	.	.	.	.	800	512	288	36
22	غدة ورمية	غدة نكفية	صلد	.	.	.	.	.	.	.	.	800	524	276	34.5
23	غدة ورمية	غدة نكفية	صلد	.	.	.	.	.	.	.	.	800	692	108	13.5